



REC'D 11 MAR 2005
WIPO PCT

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le

27 DEC. 2004

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr





INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354*03

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE
page 1/2

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DD 540 • 7 / 210502

REMISE	23 DEC 2003	Répondu à l'INPI
DATE	75 INPI PARIS 34 SP	
LEU	0315273	
N° D'ENREGISTREMENT		
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		
DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE	23 DEC. 2003	
PAR L'INPI		
Vos références pour ce dossier (facultatif) B0219FR		

NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE
BECKER & ASSOCIES
35 rue des Mathurins
75008 PARIS

Confirmation d'un dépôt par télécopie		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie
2 NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>
Demande de brevet initiale ou demande de certificat d'utilité initiale		N° _____ Date _____
Transformation d'une demande de brevet européen Demande de brevet initiale		N° _____ Date _____
		N° _____ Date _____

3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)

Procédé pour identifier des composés modulant le transport inverse du cholestérol

4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE	
Pays ou organisation Date _____ N° _____	
Pays ou organisation Date _____ N° _____	
Pays ou organisation Date _____ N° _____	

 S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé « Suite »

5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)	
<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale GENFIT	
Prénoms	
Forme juridique Société Anonyme	
N° SIREN 424341907	
Code APE-NAF 731Z	
Domicile ou siège	Rue Parc Eurasanté - Lille Métropole 885, avenue Eugène Avinée
	Code postal et ville 59120 LOOS
	Pays FRANCE
Nationalité Française	
N° de téléphone (facultatif)	
Adresse électronique (facultatif)	

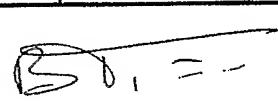
N° de télécopie (facultatif)

 S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé « Suite »Remplir impérativement la 2^{me} page

**BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ**
**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE
page 2/2**


REMISSION à l'INPI
25 DEC 2003
DATE 75 INPI PARIS 34 SP
LIEU 0315273
N° D'ENREGISTREMENT
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DB 540 W / 210502

6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)		TEZIER HERMAN
Nom		TEZIER HERMAN
Prénom		Béatrice
Cabinet ou Société		BECKER & ASSOCIES
N °de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		00-10000
Adresse	Rue	35 rue des Mathurins
	Code postal et ville	75 10 00 18 Paris
	Pays	France
N° de téléphone (facultatif)		01 53 43 85 00
N° de télécopie (facultatif)		01 53 43 85 05
Adresse électronique (facultatif)		btezier@becker.fr
7 INVENTEUR (S)		
Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques		
<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)		
8 RAPPORT DE RECHERCHE		
Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)		
<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt		
<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non		
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		
Uniquement pour les personnes physiques		
<input type="checkbox"/> Requise pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenu antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG <input type="text"/>		
10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS		
<input checked="" type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences		
<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
Le support électronique de données est joint		
La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes		
11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		 Béatrice TEZIER HERMAN CPI 00-10000
		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI
		

PROCEDE POUR IDENTIFIER DES COMPOSES MODULANT
LE TRANSPORT INVERSE DU CHOLESTEROL

5

La présente invention concerne des méthodes et composés susceptibles de moduler le transport inverse du cholestérol chez un mammifère ainsi que des méthodes de criblage permettant de sélectionner, d'identifier et/ou de caractériser des composés capables de moduler le transport inverse du cholestérol. Elle concerne également des cellules, 10 vecteurs et constructions génétiques utilisables pour la mise en œuvre de ces méthodes, ainsi que des compositions pharmaceutiques destinées au traitement de l'athérosclérose.

L'athérosclérose est une cause majeure de morbidité, de mortalité, d'infarctus du myocarde, d'ischémie cérébrale, de maladies cardiovasculaires et de la vascularisation 15 périphérique. L'hypercholestérolémie et la surcharge en cholestérol des macrophages, impliquée dans l'inflammation vasculaire, sont des facteurs majeurs qui contribuent à l'athérosclérose. L'hypercholestérolémie est actuellement traitée grâce à la combinaison d'un régime alimentaire et d'une intervention médicamenteuse avec, par exemple les statines ou des agents séquestrant les acides biliaires. Le développement de nouvelles 20 stratégies thérapeutiques est cependant nécessaire pour pallier aux limites des thérapies existantes.

Le transport inverse du cholestérol, mis en œuvre par les HDL (« High Density Lipoproteins » ou Lipoprotéines de Haute Densité), permet de décharger le cholestérol 25 qui s'accumule dans les tissus périphériques et assure son élimination métabolique via le foie. Il contribue ainsi à la protection de l'organisme contre l'athérosclérose. L'apolipoprotéine A-I (apo AI) est un constituant fondamental des HDL, responsable de leur efficacité. A cet égard, l'augmentation de l'expression de l'apo AI a un effet protecteur contre l'athérosclérose. L'expression de l'apo AI est régulée par des hormones 30 ou des agents thérapeutiques tels que les fibrates. Le rôle crucial des récepteurs nucléaires tels que HNF4, PPAR α ou ROR α dans le contrôle de la transcription du gène apo AI a été démontré. PPAR α est notamment responsable de l'augmentation de l'expression de l'apo AI par les fibrates observée chez l'homme et utilisée en clinique humaine pour le traitement des dyslipidémies. L'identification de nouvelles voies de signalisation

intracellulaire impliquées dans le contrôle de l'expression de l'apo AI permettrait donc de définir de nouvelles stratégies thérapeutiques susceptibles d'augmenter l'efficacité du transport inverse du cholestérol et donc de protéger contre l'athérosclérose.

5 Les récepteurs nucléaires aux hormones forment une grande famille de facteurs de transcription dont l'activité est modulable par des ligands naturels et/ou artificiels. Ces facteurs de transcription contrôlent l'expression de leurs gènes-cibles en se liant généralement à des éléments de réponse spécifiques agissant en *cis* et en recrutant des protéines accessoires nécessaires à l'activation de la machinerie transcriptionnelle.

10 Le récepteur nucléaire LRH-1 (Liver Receptor Homolog-1), également connu sous les noms NR5A2, CPF, hB1F, PHR ou FTF est un récepteur orphelin pour lequel aucun ligand n'a été identifié [1]. LRH-1 est un homologue du récepteur FTZ-F1 de drosophile dont le paralogue chez l'homme est le récepteur SF-1. Au moins deux isoformes, issues probablement d'un usage alternatif de certains sites de poly-adénylation, ont été 15 identifiées [2]. L'expression de LRH-1 est confinée au foie, au pancréas exocrine et à l'intestin ainsi qu'aux ovaires [3] et aux pré-adipocytes. LRH-1 est exprimé précocement lors de l'embryogenèse [4, 5].

LRH-1 ne forme pas d'hétérodimère avec RXR mais se lie, en tant que monomère, sur un élément de réponse de l'ADN de séquence YCAGGGYCR dans laquelle Y= T ou C, R= 20 G ou A. Plusieurs gènes cibles ont été identifiés dans le contrôle de la synthèse ou du transport [6] des acides biliaires, du métabolisme des stéroïdes [3] et des lipoprotéines [7, 8] ainsi que dans le contrôle de la transcription ou du développement. LRH-1 semble également impliqué dans le développement de l'endoderme [1].

25 La présente invention est fondée sur l'observation du rôle de LRH-1 dans l'expression du gène humain codant pour l'apolipoprotéine AI (apo AI) ainsi que sur l'interaction directe qui se produit entre LRH-1 et un fragment du promoteur de ce gène. Elle est fondée également sur l'observation originale d'une stimulation de l'activité du promoteur de l'apo AI humain, par la sur-expression de LRH-1. Elle se fonde également sur 30 l'identification d'un élément de réponse fonctionnel à LRH-1 à la jonction des régions B et C du promoteur du gène de l'apo AI humaine (définies selon [16]) et la caractérisation de sa séquence.

La présente invention démontre ainsi pour la première fois une modulation de la

production de l'apo AI par le récepteur nucléaire LRH-1. La présente invention fournit ainsi de nouvelles cibles et de nouvelles approches pour la recherche de composés capables de réguler l'expression de cette protéine, l'activité des HDL ou le transport inverse du cholestérol.

5 L'invention fournit également des méthodes pour accroître le transport inverse du cholestérol basées sur l'utilisation de composés qui modulent la liaison de LRH-1 au promoteur de l'apo AI et/ou l'effet de celui-ci sur la transcription du gène humain de l'apo AI.

10 L'invention fournit aussi des méthodes de criblage destinées à sélectionner, identifier ou caractériser des substances thérapeutiques capables de moduler l'expression du gène humain de l'apo AI et/ou l'activité des HDL et/ou le transport inverse du cholestérol.

15 Selon un mode de réalisation particulier, les méthodes de criblage selon l'invention incluent plus particulièrement les étapes suivantes :

20 - la mise en contact d'un ou de plusieurs composés avec une construction d'acide nucléique comprenant au moins un élément de réponse à LRH-1 du promoteur du gène humain de l'apo AI ou un variant fonctionnel de celui-ci,

25 - la détermination de la liaison éventuelle desdits composés sur le ou les élément(s) de réponse, et

- éventuellement la comparaison de la mesure précédente avec une mesure réalisée dans les mêmes conditions mais avec une construction d'acide nucléique comprenant au moins une copie mutée d'un élément de réponse à LRH-1 du promoteur de l'apo AI humaine.

Généralement, ladite mise en contact est réalisée dans des conditions susceptibles de permettre aux dits composés de se fixer sur ledit élément de réponse,

30 Selon une forme particulière de réalisation du procédé de l'invention, les conditions susceptibles de permettre aux dits composés de se fixer sur le ou lesdits élément(s) de réponse à LRH-1 comprennent la présence du récepteur LRH-1, en général exogène, (par exemple sous forme de monomère) ou d'un équivalent fonctionnel, et la détermination de la liaison éventuelle dudit composé test sur l'élément de réponse à LRH-1 et/ou sur le

complexe formé par la liaison de LRH-1 à son élément de réponse.

5 Selon un autre mode de réalisation particulier (test d'activité transcriptionnelle), on mesure l'effet d'un ou de plusieurs composés tests, éventuellement en présence du récepteur LRH-1 exogène ou d'un équivalent fonctionnel de celui ci, sur l'activité transcriptionnelle d'un promoteur comprenant au moins un élément de réponse à LRH-1 selon l'invention. Un tel test est préférentiellement réalisé en système cellulaire, par détermination de l'expression d'un gène rapporteur placé sous le contrôle d'un tel 10 promoteur, notamment dans une cellule comprenant du LRH-1 exogène ou un équivalent et/ou comprenant un ligand de LRH-1 ou un équivalent fonctionnel de celui-ci. Selon un autre mode de réalisation, le test est réalisé dans une cellule comprenant (e.g., exprimant, de manière naturelle ou recombinante) le récepteur LRH-1 ou un équivalent fonctionnel de celui-ci.

15 Une forme préférée de mise en œuvre de l'invention consiste à utiliser, éventuellement en présence de LRH-1 exogène ou d'un équivalent, une cassette d'expression combinant un ou plusieurs éléments de réponse à LRH-1, selon l'invention, avec un gène rapporteur. Avantageusement, ledit gène rapporteur est placé sous le contrôle d'un promoteur 20 comprenant au moins une copie du ou desdits éléments de réponse, par exemple, le promoteur de l'apo AI ou des variants ou fragments de celui-ci. Tout gène connu de l'homme du métier dont l'activité ou la présence dans des extraits biologiques est facilement mesurable peut être utilisé comme gène rapporteur pour la mise en œuvre du procédé de criblage.

25 Les composés susceptibles d'être identifiés par le procédé de l'invention peuvent être des composés de nature, structure et origine variées, notamment des composés biologiques, des facteurs nucléaires, des cofacteurs, des composés chimiques, synthétiques, etc., capables de modifier l'activité de LRH-1. Il peut s'agir également de banques, 30 notamment de chimiothèques ou de banques de protéines, peptides ou acides nucléiques, par exemple de clones codant des protéines ou peptides liant l'ADN.

Les méthodes selon l'invention peuvent être utilisées pour sélectionner, identifier ou caractériser des composés capables de modifier la liaison de LRH-1 et/ou des ses

cofacteurs à l'un et/ou l'autre de ses élément(s) de réponse et/ou de moduler (i.e. augmenter ou diminuer) l'expression du gène codant pour l'apo AI humaine et ainsi l'expression de l'apo AI humaine et/ou de moduler l'activité des HDL et/ou de moduler le transport inverse du cholestérol.

5

L'invention décrit encore l'utilisation des composés ainsi sélectionnés, dans la préparation d'une composition destinée à moduler le transport inverse du cholestérol ou l'activité des HDL, ainsi que les méthodes de traitement correspondantes.

10 Dans le but de faciliter la compréhension de la présente demande, les définitions suivantes sont fournies, qui précisent ou complètent leur signification habituelle.

“Apolipoprotéine AI” ou apo AI: L'apolipoprotéine AI est une protéine de 243 acides aminés qui contient une extrémité amino-terminale globulaire et une extrémité carboxy-terminale qui est capable de se lier aux lipides [9]. Cette protéine est un constituant majeur des lipoprotéines de haute densité et joue un rôle fondamental dans le transport inverse du cholestérol [10, 11]. Le gène, l'ADNc et l'ARNm de l'apo AI ont été clonés et séquencés [12-14], et sont accessibles sur banques de données Genbank® (par exemple sur Internet à l'adresse : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) sous les numéros d'accès :
15 20 NM_000039, M20656 (Promoteur) et J00098.

“High Density Lipoprotein (HDL)”: Les particules HDL sont des lipoprotéines de haute densité (1,063-1,21g/ml) réputées pour avoir un rôle protecteur contre l'athérosclérose principalement du fait de leur capacité à extraire le cholestérol des cellules périphériques et à promouvoir son retour vers le foie où il est éliminé [10]. L'apo AI est le constituant protéique majeur des HDL, représentant jusqu'à 70% des protéines. Elles comportent également de l'apo AII, de l'apo CI, de l'apo CII, de l'apo CIII et de l'apo E en plus faible proportion.
25

30 “LRH-1”: Le récepteur LRH-1 a été isolé, caractérisé et séquencé chez l'homme et chez le rat. La séquence de l'ARNm est disponible également sur banques de données Genbank®, sous les numéros d'accès NM_003822, NM_030676 et NM_021742 pour l'homme, la souris et le rat, respectivement. La région de LRH-1 impliquée dans la liaison à l'ADN (« DNA Binding Domain ») est principalement comprise entre les

résidus Glu38-Asp113 de la protéine humaine (correspondant à 319-546 dans NM_003822) ou entre les résidus Glu105-Asp180 de la protéine de souris.

L'expression « équivalent fonctionnel » qui fait référence au récepteur LRH-1, désigne 5 tout polypeptide dérivé de la structure du récepteur LRH-1 et conservant la capacité de liaison à l'élément de réponse notamment tout élément de réponse de séquence SEQ ID NO : 1 ou des variants fonctionnels de celle-ci. Les équivalents fonctionnels peuvent être 10 des variants naturels (polymorphisme, épissage, etc.), des fragments, mutants, délétants, etc.. Préférentiellement, il s'agit de polypeptides comprenant au moins une région d'acides aminés identique à 60% au moins à celle du récepteur LRH-1, de manière préférentielle à 75% au moins et de manière encore plus préférentielle à 90-95% au moins. L'expression inclut également les fragments du récepteur LRH-1, notamment les fragments contenant le site de liaison à l'ADN du récepteur LRH-1.

15 Le terme "transport inverse" est employé pour désigner le mécanisme physiologique, parfois défaillant, par lequel le cholestérol en excès dans les tissus périphériques est pris en charge par des lipoprotéines de haute densité, les HDL (High Density Lipoprotein), puis transporté vers le foie pour être éliminé.

20 A. Identification d'un élément de réponse à LRH-1.

La présente invention démontre l'implication et le mécanisme d'action de LRH-1 dans la régulation de l'expression de l'apo AI et, ce faisant, dans la régulation du transport inverse du cholestérol. La sur-expression de LRH-1 se traduit par une augmentation de 25 l'activité du promoteur de l'apo AI. L'invention révèle, par ailleurs, la séquence précise de l'élément de réponse à LRH-1, au sein du promoteur du gène codant pour l'apo AI humaine.

L'invention porte également sur des constructions particulières, notamment des acides nucléiques comprenant des éléments de réponse à LRH-1, ainsi que des cassettes, 30 vecteurs et cellules recombinantes les contenant.

Ainsi l'invention fournit la séquence (SEQ ID NO : 1) de l'élément de réponse à LRH-1, identifié initialement au sein du promoteur du gène humain de l'apo AI, responsable d'une interaction entre LRH-1 et le promoteur apo AI et de la régulation par LRH-1 de

l'expression de l'apo AI.

3 régions fonctionnelles différentes ont été identifiées au sein du promoteur de l'apo AI [15]. Dans le document présent, les régions fonctionnelles du promoteur du gène de l'apolipoprotéin A-I sont nommées A, B et C selon la nomenclature définie précédemment [16].

Ainsi, la présence des régions B et C (SEQ ID NO : 3 et 4) provoque une augmentation par LRH-1 de l'expression d'un gène rapporteur (cf. : exemples 1, 2, 5 et 6).

10 Un objet particulier de l'invention réside dans un acide nucléique comprenant la séquence SEQ ID NO : 1 suivante :

5'-CTGATCCTTGAAC-3', ou un variant fonctionnel de celle-ci (« élément de réponse LRH-1 »).

15 Un autre objet de l'invention réside dans une construction d'acide nucléique comprenant un élément de réponse LRH-1 tel que défini ci-dessus. Il peut s'agir notamment d'une cassette d'expression comprenant au moins une copie d'un élément de réponse tel que défini ci-avant.

L'invention concerne encore tout promoteur artificiel ou chimérique comprenant un élément de réponse à LRH-1 tel que défini ci-avant.

20 Les variants fonctionnels de l'élément de réponse selon l'invention, peuvent être tout dérivé ou fragment de la séquence native conservant la capacité de lier le récepteur LRH-1. Généralement, les variants conservent au moins 50% des résidus de la séquence native décrite dans la présente demande. Classiquement, les variants possèdent des modifications affectant moins de 5 nucléotides dans la séquence considérée.

25 Préférentiellement, il s'agit d'un séquence identique à 60% au moins, de manière préférentielle à 75% au moins et de manière encore plus préférentielle à 90% au moins à la séquence native décrite dans la présente demande.

Les variants peuvent comporter différents types de modifications tels qu'une ou plusieurs mutations ponctuelles ou non, additions, délétions et/ou substitutions.

30 Ces modifications peuvent être introduites par les méthodes classiques physiques, chimiques ou de la biologie moléculaire, telles que notamment la mutagenèse dirigée ou, plus pratiquement, par synthèse artificielle de la séquence dans un synthétiseur.

Les variants peuvent être testés pour leur capacité de liaison à LRH-1 de différentes

façons, et notamment :

5 (i) par mise en contact de la séquence test avec le récepteur LRH-1 (par exemple dans un test acellulaire), et détection de la formation d'un complexe (par exemple par retard de migration sur gel) ;

10 (ii) par insertion de la séquence test dans une cassette d'expression comprenant un promoteur minimal et un gène rapporteur, introduction de la cassette dans une cellule, et détection (le cas échéant dosage) de l'expression du gène rapporteur en présence et en l'absence de LRH-1 ;

15 (iii) par toute autre technique connue de l'homme du métier, permettant de mettre en évidence l'interaction entre un acide nucléique et une protéine, par exemple.

L'invention a encore pour objet des variants inactifs des éléments de réponse définis ci-dessus, notamment des variants essentiellement incapables de lier le récepteur LRH-1.

15 Des exemples de tels variants sont notamment la séquence SEQ ID NO : 2.

Ces variants inactifs peuvent être préparés et testés dans les conditions décrites ci-dessus pour les variants fonctionnels.

Les variants selon l'invention possèdent avantageusement la capacité d'hybrider avec la séquence SEQ ID NO : 1 ou une partie de celle-ci.

20

B. Méthodes de sélection, d'identification et de caractérisation de composés qui modulent le transport inverse du cholestérol.

L'invention décrit des méthodes d'identification de composés qui modulent (i.e., 25 augmentent ou diminuent) le transport inverse du cholestérol. Ces composés peuvent agir en altérant la liaison de LRH-1 à son ou ses ligands ou à son ou ses corépresseurs et coactivateurs, etc.. Ils peuvent encore modifier, voir supprimer, la liaison de LRH-1 seul ou de LRH-1 et de ses cofacteurs, à son ou ses élément(s) de réponse et ainsi modifier l'expression du gène humain de l'apo AI. La fixation de LRH-1 à l'élément de réponse 30 présent à la jonction des régions B et C du promoteur de l'apo AI (SEQ ID NO: 3 et 4) augmente ainsi la transcription du gène humain de l'apo AI et stimule le transport inverse du cholestérol. L'utilisation de composés capables d'augmenter la fixation de LRH-1 à cet élément de réponse, où LRH-1 joue le rôle d'activateur permet donc d'augmenter la transcription du gène humain de l'apo AI et de stimuler le transport inverse du

cholestérol.

La présente invention décrit ainsi de nouvelles méthodes pour la sélection, l'identification ou la caractérisation de composés capables d'augmenter le transport inverse du cholestérol.

5

1. Méthodes basées sur un criblage d'expression.

La présente invention concerne une méthode pour la sélection, l'identification ou la 10 caractérisation de composés capables de moduler le transport inverse du cholestérol, qui comprend :

(i) la mise en contact d'un composé test avec une cellule hôte comprenant une cassette d'expression d'un gène rapporteur, ladite cassette comprenant un gène rapporteur placé sous le contrôle d'un promoteur contenant au moins une copie d'un élément de réponse à LRH-1 du promoteur du gène humain de l'apo AI ou d'un variant fonctionnel de celui-ci, et

(ii) la détermination de l'expression du gène rapporteur.

20 La présente invention concerne par ailleurs une méthode pour la sélection, l'identification ou la caractérisation de composés capables de moduler le transport inverse du cholestérol, qui comprend :

(i) la mise en contact, en présence du récepteur LRH-1 exogène ou d'un équivalent fonctionnel de celui ci, d'un composé test avec une cellule hôte comprenant une cassette d'expression d'un gène rapporteur, ladite cassette comprenant un gène rapporteur placé sous le contrôle d'un promoteur contenant au moins une copie d'un élément de réponse à LRH-1 du promoteur du gène humain de l'apo AI ou d'un variant fonctionnel de celui-ci, et

25 (ii) la détermination de l'effet de la présence du composé test sur la liaison de LRH-1 à l'élément de réponse ou sur l'expression du gène rapporteur.

Les méthodes selon l'invention, prévoient plus spécifiquement la mise en contact d'un composé test avec une construction d'acide nucléique ou une cassette d'expression

comprenant au moins une copie d'un élément de réponse à LRH-1 (SEQ ID NO : 1).

Un objet particulier de l'invention concerne une cassette d'expression comprenant au moins une copie du fragment d'acide nucléique SEQ ID NO : 1, et un promoteur associé à un gène rapporteur placé sous le contrôle dudit promoteur.

5

Un autre objet particulier de l'invention concerne une cassette d'expression comprenant au moins une copie mutée du fragment d'acide nucléique SEQ ID NO : 1, et un promoteur associé à un gène rapporteur placé sous le contrôle dudit promoteur.

10 Selon un mode d'exécution particulier des méthodes de l'invention, il est en outre prévu de comparer les effets éventuels, déterminés grâce à l'une de ces méthodes avec ceux, éventuels, déterminés grâce à une méthode réalisée dans les mêmes conditions mais avec une construction d'acide nucléique comprenant au moins un variant inactif (par exemple, une copie mutée) d'un élément de réponse à LRH-1 du promoteur du gène codant pour
15 l'apo AI humain (SEQ ID NO : 2) ou d'un variant fonctionnel de ce dernier.

Les procédés de l'invention peuvent être mis en œuvre avec différents types de cellules, de promoteurs, de gènes rapporteurs, et dans différentes conditions, comme il est décrit ci-après.

20

a) Mise en contact des composés avec la cellule hôte

Certaines méthodes de criblage, décrites par l'invention, prévoient une étape de mise en contact du composé test, éventuellement en présence du récepteur LRH-1 exogène ou
25 d'un équivalent fonctionnel de celui ci, avec des cellules hôtes, dans des conditions particulières qui permettent de déterminer l'expression dans lesdites cellules d'un gène rapporteur et d'obtenir ainsi une information concernant l'effet du composé test.

Préférentiellement, Le récepteur LRH-1 est introduit ou ajouté artificiellement de manière à avoir au moins 2 fois la quantité de LRH-1 endogène. Il peut s'agir d'un équivalent de
30 LRH-1 à savoir toute séquence d'acides aminés identique à 60% au moins à celle du récepteur LRH-1, de manière préférentielle à 75% au moins et de manière encore plus préférentielle à 90-95% au moins.

Classiquement, l'effet du composé test est comparé au niveau d'expression du gène rapporteur déterminé en l'absence dudit composé (et/ou avec un élément de réponse

muté).

Ces cellules, dans un mode préféré de l'invention, peuvent être des cellules de mammifères (hépatocytes, fibroblastes, cellules endothéliales, musculaires, etc.). De manière encore plus préférée, ces cellules peuvent être des cellules humaines. Il peut 5 également s'agir de cultures primaires ou de lignées établies. Dans un autre mode de mise en œuvre, il est possible également d'utiliser des cellules procaryotes (bactéries), des cellules de levure (Saccharomyces, Kluyveromyces, etc.), des cellules végétales, etc..

Les composés peuvent être mis au contact des cellules à différents moments, selon leur(s) effet(s), leur concentration, la nature des cellules et l'appréciation technique.

10 Le contact peut être effectué sur tout support approprié et notamment sur une plaque, dans un tube ou une flasque. Généralement, la mise en contact est réalisée dans une plaque multipuits ce qui permet de conduire, en parallèle, des essais nombreux et variés. Parmi les supports typiques on trouve des plaques de microtitration et plus particulièrement des plaques 96 ou 384 puits (ou plus), faciles à manipuler et sur lesquels 15 la révélation peut être obtenue grâce à une stimulation classique.

Selon le support et la nature du composé test, des quantités variables de cellules peuvent être utilisées lors de la mise en œuvre des méthodes décrites. De manière classique, 10^3 à 20 10^6 cellules sont mises en contact avec un type de composé test, dans un milieu de culture approprié, et de manière préférentielle entre 10^4 et 10^5 cellules. A titre d'exemples, dans une plaque de 96 puits, 10^5 cellules peuvent être incubées dans chaque puit avec une quantité voulue d'un composé test. Dans une plaque de 384 puits, moins de 10^5 cellules et typiquement entre 1×10^4 et 4×10^4 cellules sont généralement incubées dans chaque puit avec le composé test.

25 La quantité (ou la concentration) de composé test peut être ajustée par l'utilisateur selon le type de composé (sa toxicité, sa capacité de pénétration cellulaire, etc.), le nombre de cellules, la longueur de la période d'incubation, etc.. Généralement, les cellules sont exposées à des quantités de composés test qui varient de 1nM à 1mM. Il est bien sûr possible de tester d'autres concentrations sans dévier de la présente invention. Chaque composé peut de plus être testé en parallèle à différentes concentrations.

30 Différents adjuvants et/ou vecteurs et/ou produits facilitant la pénétration des composés dans les cellules tels que des liposomes, des lipides cationiques, des polymères, de la pénétratine, du Tat PDT, des peptides issus d'adénovirus (penton ou fibres) ou d'autres virus, etc. peuvent en outre être utilisés si nécessaire.

Le contact est maintenu entre 5 et 72 heures, généralement entre 12 et 48 heures. En effet,

les cellules et les divers réactifs doivent de préférence rester en contact suffisamment longtemps pour permettre la synthèse de novo du produit d'expression du gène rapporteur. De manière préférée, l'incubation dure environ 36 heures.

5 b) Détermination de l'activité des composés.

La méthode proposée par l'invention pour sélectionner, identifier ou caractériser des composés capables de moduler le transport inverse du cholestérol prévoit la transformation des cellules hôtes avec une cassette d'expression d'un gène rapporteur. 10 Ledit gène rapporteur peut être notamment tout gène dont le produit de transcription ou d'expression peut être détecté ou dosé dans des extraits biologiques. Il peut s'agir, par exemple, du gène codant pour l'apo AI humaine lui-même, ou encore du gène codant pour la luciférase et plus particulièrement pour la luciférase de luciole ou pour celle de Renilla, pour la phosphatase alcaline sécrétée, la galactosidase, la lactamase, la 15 Chloramphenicol acetyl transferase (CAT), l'hormone de croissance humaine (hGH), la β -glucuronidase (Gluc) et la Green fluorescent protein (GFP) etc.. Il est entendu que le terme « gène » désigne, au sens large, tout acide nucléique, notamment un ADNc, un ADNg, un ADN synthétique, un ARN, etc..

Le gène rapporteur, quel qu'il soit, est placé sous le contrôle d'un promoteur comprenant 20 au moins une copie d'un élément de réponse à LRH-1 tel que défini ci-avant.

Le gène rapporteur peut donc être placé sous le contrôle de tout promoteur dont la séquence comprend la séquence SEQ ID NO : 1 ou un variant fonctionnel de celle-ci. Cette séquence particulière peut être présente à raison d'une ou de plusieurs copies dans le promoteur (préférentiellement 1 à 10 et encore plus préférentiellement 1 à 6), en 25 amont, en aval ou en interne, dans la même orientation ou dans l'orientation opposée. Préférentiellement, il s'agit d'un promoteur dont le différentiel d'activité en l'absence et en présence de LRH-1 ou d'un équivalent fonctionnel peut être détecté.

Pour la réalisation d'un promoteur de l'invention, l'élément de réponse à LRH-1 peut être 30 associé à un promoteur minimal transcriptionnel. Le promoteur minimal est un promoteur transcriptionnel ayant une activité basale faible ou inexistante, et susceptible d'être augmentée en présence d'un activateur transcriptionnel (l'interaction de LRH-1 avec la jonction des régions B et C). Un promoteur minimal peut donc être un promoteur naturellement faible dans les cellules de mammifère, c'est-à-dire produisant une

expression non toxique et/ou non suffisante pour obtenir un effet biologique prononcé. Avantageusement, un promoteur minimal est une construction préparée à partir d'un promoteur natif, par déletion de région(s) non essentielle(s) à l'activité transcriptionnelle. Ainsi, il s'agit de préférence d'un promoteur comprenant essentiellement une boîte 5 TATA, généralement d'une taille inférieure à 160 nucléotides, centrée autour du codon d'initiation de la transcription. Un promoteur minimal peut ainsi être préparé à partir de promoteurs viraux, cellulaires, forts ou faibles, tels que par exemple le promoteur du gène de la thymidine kinase (TK) du virus de l'herpès, le promoteur immédiat du CMV, le promoteur PGK, le promoteur du gène codant pour l'apolipoprotéine AI humaine, le 10 promoteur SV40, etc.. Le promoteur minimal peut avoir une activité suffisamment élevée pour permettre d'identifier des composés qui augmentent l'activation par LRH-1, via les régions B et C par exemple.

Le promoteur (P), l'élément de réponse à LRH-1 (ER) et le gène rapporteur (GR) sont agencés de manière fonctionnelle dans la cassette d'expression, c'est-à-dire de sorte que 15 le promoteur minimal contrôle l'expression dudit gène et que son activité soit régulée par LRH-1. Généralement, ces régions sont donc disposées dans l'ordre suivant, dans l'orientation 5'->3' : ER-P-GR. Toutefois, tout autre agencement fonctionnel peut être envisagé par l'homme du métier sans départir de la présente invention.

En outre, les différents domaines fonctionnels ci-dessus peuvent être liés directement les 20 uns aux autres, ou séparés par des nucléotides n'affectant pas significativement le caractère fonctionnel de la cassette d'expression ou permettant de conférer des caractéristiques ou performances améliorées au système (amplificateur, silencer, intron, site d'épissage, etc.).

25 La méthode de sélection, d'identification et de caractérisation de composés capables de moduler le transport inverse du cholestérol prévoit une étape de détermination de l'expression du gène rapporteur. Il peut s'agir d'une détermination de l'activité transcriptionnelle. A cette fin, l'ARN total est extrait des cellules en culture dans des conditions expérimentales d'une part et dans une situation témoin d'autre part. Cet ARN 30 est utilisé comme sonde pour analyser, par exemple, les changements dans l'expression du ou des gène(s) rapporteur(s).

Il peut également s'agir d'une révélation de l'expression du gène rapporteur à l'aide d'un substrat adapté. Cette révélation peut être obtenue à l'aide de techniques variées dont la nature dépend du type de gène rapporteur utilisé. La mesure peut, par exemple,

correspondre à une densité optique, à une émission fluorescente ou luminescente dans le cas d'une utilisation comme gène rapporteur du gène codant pour la β -galactosidase ou la luciférase.

Dans un mode particulier, l'expression du gène rapporteur est mesurée à travers le niveau 5 d'hydrolyse d'un substrat du produit d'expression du gène rapporteur. Par exemple, de nombreux substrats peuvent être utilisés pour évaluer l'expression de la β -lactamase. Il peut notamment s'agir de tout produit contenant un noyau β -lactame et dont l'hydrolyse peut être contrôlée. Les substrats préférés sont ceux spécifiques de la β -lactamase (i.e., ils 10 ne sont généralement pas hydrolysés dans les cellules de mammifères en l'absence de β -lactamase), ceux qui ne sont pas toxiques à l'égard des cellules de mammifères et/ou dont le produit d'hydrolyse peut être contrôlé facilement, par exemple par des méthodes basées sur la fluorescence, la radioactivité, une activité enzymatique ou toute autre 15 méthode de détection.

Des substrats encore plus préférés sont les substrats ratiométriques. L'hydrolyse de ces 15 substrats peut être directement reliée à l'activité du produit d'expression du gène rapporteur par le nombre de cellules. Un substrat ratiométrique spécifique et non toxique utilisable dans la présente invention est le CCF2-AM.

La concentration du substrat peut être ajustée par l'homme du métier en fonction du nombre de cellules, par exemple. Les cellules sont généralement maintenues en contact 20 avec le substrat pendant environ 60 minutes.

La présence du produit du gène rapporteur (ou du produit d'hydrolyse du substrat) peut être déterminée par des méthodes classiques connues de l'homme du métier (fluorescence, D.O., luminescence, FRET (voir WO 0037077), SPA, biopuces, méthodes immunologiques, etc.).

25 Généralement, on détermine l'activité d'un composé test dans une cellule et cet effet est comparé au niveau d'activité en l'absence de composé test ou à une valeur moyenne déterminée en l'absence de tout composé test.

La mesure de l'hydrolyse implique essentiellement une mesure (ou la détermination de la quantité relative) du produit d'hydrolyse contenu dans chaque échantillon réactionnel.

30 Cette mesure peut être réalisée grâce à différentes techniques connues de l'homme du métier, incluant la détection d'une fluorescence, d'une radioactivité, d'une couleur, d'une activité enzymatique, d'un immun complexe antigène-anticorps, etc.. De manière préférée, le produit d'hydrolyse est détecté et quantifié grâce à une technique de détection

de fluorescence. Des fluorochromes variés peuvent ainsi être utilisés et contrôlés sur des échantillons de cellules.

Un test secondaire permettant de valider, chez l'animal, la sélection des composés, peut aussi être réalisé grâce à la détermination de la quantité d'HDL exprimées ou grâce à la 5 détermination d'une variation significative du transport inverse du cholestérol au niveau de cellules traitées avec lesdits composés par comparaison avec des cellules non traitées. Il est également possible de mesurer le taux plasmatique de cholestérol et/ou de déterminer l'expression hépatique de l'apo AI.

10 Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, la cellule hôte comprend également un ligand de LRH-1. La désignation « ligand de LRH-1 » s'applique également aux facteurs de transcription, aux co-activateurs et co-répresseurs, ainsi qu'aux autres polypeptides impliqués dans la machinerie de régulation de l'expression de gènes. Il peut s'agir, par exemple, d'autres récepteurs comme RXR ou les récepteurs aux hormones 15 nucléaires.

Selon un autre mode préféré de réalisation de l'invention, on utilise dans les méthodes selon l'invention, et comme indiqué précédemment, une cellule hôte comprenant le récepteur LRH-1 ou un équivalent fonctionnel. La présence du récepteur LRH-1 permet 20 de reproduire une situation physiologique et permet d'identifier, grâce aux méthodes précédemment décrites, des composés capables de moduler les interactions entre LRH-1 et l'un et/ou l'autre de ses élément(s) de réponse, tel(s) que divulgué(s) par la présente invention, ou entre LRH-1 et un ou plusieurs ligand(s) de LRH-1.

25 Les méthodes selon l'invention permettent de déterminer le niveau d'expression du gène rapporteur, selon l'une des techniques connues de l'homme du métier décrites précédemment, en présence du composé test et/ou en l'absence dudit composé, une augmentation ou une diminution du niveau d'expression du gène rapporteur signalant l'aptitude du composé test à moduler le transport inverse du cholestérol.

30 L'invention peut donc être mise en œuvre à l'aide d'une construction, d'une cassette ou d'une cellule selon l'invention utilisée pour le criblage in vitro de composés capables de moduler l'activité des HDL.

Comme indiqué précédemment, ces méthodes permettent le criblage, rapide et en parallèle, de nombreux composés test sur une ou plusieurs populations cellulaires (cellules de mammifère, cellules humaines telles que, par exemple, des hépatocytes, cellules procaryotes, etc.). Ces méthodes sont prédictives, automatisables et adaptées à la 5 sélection, l'identification et la caractérisation desdits composés.

Une forme particulière de mise en œuvre du procédé de criblage utilise les méthodes classiques d'identification de clones qui expriment des protéines qui lient l'ADN. Il peut s'agir par exemple de cribler des banques d'expression d'ADNc dans λ gt11 ou d'utiliser la méthode dite du « One Hybrid » ou du « Phage Display », ou encore de pratiquer une 10 purification par chromatographie d'affinité. La ou les protéine(s) isolée(s) sont ensuite séquencées.

2. Méthodes basées sur un test de liaison.

15 L'invention concerne également une méthode pour la sélection, l'identification ou la caractérisation de composés capables de moduler (i.e. augmenter ou diminuer) le transport inverse du cholestérol, basée sur la mesure de la liaison d'un composé test à l'un ou à plusieurs éléments de réponse. Cette méthode comprend plus particulièrement :

20 - la mise en contact d'un composé test avec une construction d'acide nucléique comprenant au moins une copie d'un élément de réponse à LRH-1 du promoteur du gène humain de l'apo AI ou d'un variant fonctionnel de celui-ci, et
- la détermination de la liaison éventuelle dudit composé test sur l'élément de réponse.

25

Une autre méthode selon l'invention comprend :

30 - la mise en contact, en présence du récepteur LRH-1 exogène ou d'un équivalent fonctionnel de celui ci, d'un composé test avec une construction d'acide nucléique comprenant au moins une copie d'un élément de réponse à LRH-1 du promoteur du gène humain de l'apo AI ou d'un variant fonctionnel de celui-ci, et
- la détermination de la liaison du composé test sur le et/ou les élément(s) de réponse à LRH-1 et/ou sur le complexe formé par la liaison de LRH-1 à son et/ou ses élément(s) de réponse. Un mode préféré de réalisation de l'invention consiste à établir la

capacité dudit composé test à moduler la liaison de LRH-1 à l'élément de réponse, en déterminant la quantité de LRH-1 liée en présence du composé test par rapport à cette quantité en l'absence de composé test. Un test de compétition utilisant la technique FP (Fluorescence Polarization) connue de l'homme du métier peut ainsi s'appliquer efficacement dans le cadre de cette détermination.

5 Un composé test capable de moduler la liaison de LRH-1 à l'élément de réponse pourra faire l'objet d'un test ultérieur de sa capacité à moduler l'expression d'un gène rapporteur et/ou le transport inverse du cholestérol, selon l'une des méthodes décrites précédemment.

10 La liaison du composé test sur l'un au moins des éléments de réponse à LRH-1 peut être mise en évidence grâce à une migration sur gel, par électrophorèse des hétérodimères formés suite à la mise en œuvre de la méthode décrite ci-dessus. Certains composés tests sont effectivement susceptibles de porter un site de liaison à l'ADN en grande partie identique à celui de LRH-1 et d'exercer ainsi une compétition avec celui-ci.

15 L'électrophorèse permet de distinguer directement les hétérodimères LRH-1/élément de réponse à LRH-1, des hétérodimères composé test/élément de réponse à LRH-1 et des éléments de réponse à LRH-1.

D'autres méthodes basées sur la luminescence ou utilisant la technique FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) bien connue de l'homme du métier ou la 20 technique SPA (Scintillation Proximity Assay), peuvent être mises en œuvre dans le cadre de la présente invention pour déterminer la liaison éventuelle du composé test sur l'un et/ou l'autre élément(s) de réponse à LRH-1.

25 Dans un mode particulier, la construction d'acide nucléique comprend au moins 1 copie, de préférence de 2 à 5 copies de la séquence SEQ ID NO :1 ou d'un variant fonctionnel de celle-ci. Les composés tests capables d'activer (c'est-à-dire d'augmenter au moins partiellement) la liaison de LRH-1 sur cette construction permettent d'activer l'expression du gène rapporteur et constituent des candidats pour stimuler le transport inverse du cholestérol.

30

C. Activité des HDL et de l'apolipoprotéine AI.

Les méthodes décrites précédemment pour la sélection, l'identification ou la caractérisation de composés capables de moduler l'expression d'un gène rapporteur et/ou

le transport inverse du cholestérol peuvent, selon un autre mode de réalisation de l'invention, être utilisées pour la sélection, l'identification ou la caractérisation de composés capables de moduler l'activité des HDL et/ou l'expression de l'apo AI.

5 D. **Composés test.**

La présente invention peut être appliquée à tout type de composé test. Ainsi, le composé test peut être tout produit qui se présente sous une forme isolée ou en mélange avec d'autres produits. Le composé peut être défini en termes de structure et/ou de composition ou ne pas être défini. Le composé peut, par exemple, être un produit isolé et structurellement défini, un produit isolé de structure indéfinie, un mélange de produits connus et caractérisés ou une composition indéfinie comprenant un ou plusieurs produits. Un ou plusieurs composés peuvent ainsi être testés, en mélange ou de manière séparée. De telles compositions indéfinies peuvent être, par exemple, des échantillons de tissus, 15 des fluides biologiques, des surnageants cellulaires, des préparations végétales, etc.. Les composés test peuvent être des produits inorganiques ou organiques et notamment un polypeptide (ou une protéine ou un peptide), un acide nucléique, un lipide, un polysaccharide, un composé chimique ou biologique tel qu'un facteur nucléaire, un cofacteur ou tout mélange ou dérivé de ces derniers. Le composé peut être d'origine 20 naturelle ou synthétique et inclure une banque combinatoire, un clone ou une banque de clones d'acides nucléiques exprimant un ou plusieurs polypeptide(s) liant l'ADN, etc..

La présente invention est particulièrement adaptée à la sélection, l'identification ou la caractérisation d'un nombre important de composés. Ce criblage simple et efficace peut 25 être accompli en un laps de temps très court. Les méthodes décrites peuvent en particulier être partiellement automatisées, autorisant ainsi le criblage efficace et simultané de composés divers et nombreux, soit sous forme de mélange soit sous forme séparée.

30 E. **Utilisation des composés identifiés.**

Les composés identifiés selon l'invention présentent des propriétés avantageuses pour une utilisation thérapeutique, notamment dans le domaine de l'athérosclérose.

L'invention prévoit ainsi l'utilisation d'un composé capable de moduler (i.e., augmenter ou diminuer) la liaison de LRH-1 aux éléments de réponse du promoteur du gène codant

pour l'apo AI humain ou d'un variant fonctionnel de celui-ci, pour la préparation d'une composition destinée à moduler (i.e., augmenter ou diminuer) le transport inverse du cholestérol. Selon un autre mode de réalisation de l'invention, cette utilisation peut être destinée à moduler (i.e., augmenter ou diminuer) l'activité des HDL ou à moduler 5 l'expression de l'apo AI.

Un autre mode de réalisation de l'invention prévoit l'utilisation d'un composé capable de moduler (i.e. augmenter ou diminuer) l'effet de LRH-1 sur la transcription du gène humain de l'apo AI ou d'un variant fonctionnel de celui-ci, pour la préparation d'une composition destinée à moduler (i.e. accroître) le transport inverse du cholestérol et/ou à 10 moduler (i.e., augmenter ou diminuer) l'activité des HDL.

Selon un mode de réalisation préféré de l'invention il s'agit d'un composé chimique ou 15 d'un composé biologique. Selon un autre mode préféré, il s'agit d'un facteur nucléaire ou d'un cofacteur. Selon un mode encore plus préféré, il s'agit d'un clone exprimant un ou plusieurs polypeptide(s) liant l'ADN. D'une manière générale, il peut s'agir de tout composé sélectionné, identifié ou caractérisé selon l'une des méthodes précédemment décrites.

20 L'invention inclut l'utilisation de tout composé (ou dérivés desdits composés) sélectionné, identifié ou caractérisé selon l'une des méthodes précédemment décrites, dans le cadre de la présente invention, comme cible de recherches expérimentales ou pour la fabrication de compositions pharmaceutiques destinées à augmenter le transport inverse du cholestérol ou à traiter l'hypercholestérolémie, l'athérosclérose, les désordres lipidiques et/ou les affections cardio-vasculaires, ainsi que lesdites compositions pharmaceutiques.

25

D'autres avantages et applications de la présente invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme purement illustratifs et non limitatifs.

30

LEÉGENDES DES FIGURES

5 **Figure 1 :** Effet de la sur-expression de LRH-1 sur l'activité du promoteur de l'apo AI humaine dans les cellules HepG2 (URL : unité relative de luminescence).

10 **Figure 2 :** Effet de la sur-expression de LRH-1 sur l'activité du promoteur de l'apo AI humaine dans les cellules RK13 (URL : unité relative de luminescence).

15 **Figure 3 :** Retard sur gel montrant l'identification d'un élément de réponse à LRH-1 compris à la jonction de la région B et C du promoteur de l'apo AI humaine. Les complexes séparés, apparaissant sur le gel d'électrophorèse, sont identifiés dans l'exemple 3.

20 **Figure 4 A/B:** Retard sur gel montrant l'identification d'un élément de réponse à LRH-1 compris dans le fragment -144/-122 du promoteur de l'apoAI humaine.

25 **Figure 5 :** Effet de la surexpression de LRH-1 sur l'activité du promoteur de l'apo AI humaine muté ou non dans les cellules HuH7 (URL : unité relative de luminescence).

30 **Figure 6 :** Effet de la surexpression de LRH-1 sur l'activité de différents mutants du promoteur de l'apo AI humaine dans les cellules HuH7.

SÉQUENCES

35 **SEQ ID NO : 1** (Elément de réponse à LRH-1 du promoteur du gène de l'apo AI humaine)
5'-CTGATCCTTGAAC-3'

40 **SEQ ID NO :2** (Elément de réponse à LRH-1 muté du gène de l'apo AI muté)

45 5'-CTGATTGTTGAAC-3'

50 **SEQ ID NO : 3** (Région B du promoteur du gène de l'apo AI humaine)

5'-
GCAGCCCCCGCAGCTGCTGTTGCCCACTCTATTGCCAGCCCCAGGGACAGA
GCTGATCCTT -3'

5

SEQ ID NO: 4 (Région C du promoteur du gène de l'apoAI humaine):

5'-

GAACTCTTAAGTCCACATTGCCAGGACCAGTGAGCAGCAACAGGGCCGGGG
CTGGGCTTATCAGCCTCCCAGCCCCAGACCCCTGGCT -3'

10

SEQ ID NO : 5 (Promoteur de l'apo AI – j04066 (apoAI gene) 1819-2167)

5'-

gggagacctgcaaggcctgcagcactccctccgcggccactgaacccttgcaccctgcgcggccgcagcttgctgttgcc
cactctatggccagccccagggacagagctgatccttgcactcttaagttccacattgcaggaccagtggcggccgc
15 gggctggcttatcagcctcccagccagaccctggctgcagacataataggccctgcaagagctggctgttagagactgcgaga
aggaggtgcgtcctgctgcctgccccggtaactctggctcccaaggttcaggccttgccccaggccggcctctgggtac-
3'

SEQ ID NO : 6 (promoteur Tk – M80483 (pBLCAT5) 38-204 ; J02224 (Herpes
20 simplex) 302-462)

5'-

tgcggcccccagcgtttgtcattggcgaattcgaacacgcagatgcagtcggggcgccggccagggtccacttcgcatttgcatttgc
tgacgcgtgtggctcgaacaccgagcgcaccctgcagcgcaccgcgttaacagcgtcaacacgcgtccgcagatcacag-3'

25

SEQ ID NO : 7 (séquence sens de hCyp7a wt):

5'-GATCTCTTAGTTCAAGGCCAGTTAG-3'

SEQ ID NO : 8 (séquence antisens de hCyp7a wt):

5'-GATCCTAACTGGCCTTGAACTAAGA-3'

30

SEQ ID NO : 9 (séquence sens hCyp 7 a mut):

5'-GATCTCTTAGTTCAATTCCAGTTAG-3'

SEQ ID NO : 10 (séquence antisens hCyp 7 a mut):

5'-GATCCTAACTGGAATTGAACTAAGA-3'

35

SEQ ID NO : 11 (séquence sens LHRE_ApoA1_h_5):

5'-GATCCGCAGCCCCGCAGCTTGCTGTA-3'

5 **SEQ ID NO : 12** (séquence antisens LHRE_ApoA1_h_5):

5'-GATCTACAGCAAGCTGCGGGGCTGCG-3'

SEQ ID NO : 13 (séquence sens LHRE_ApoA1_h_6):

5'-GATCCTTGCCTCACTCTATTGCCAGCCCCAA-3'

10

SEQ ID NO : 14 (séquence antisens LHRE_ApoA1_h_6):

5'-GATCTTGGGGCTGGGCAAATAGAGTGGGCAAG-3'

SEQ ID NO : 15 (séquence sens LHRE_ApoA1_h_7):

15 5'-GATCCGGGACAGAGCTGATCCTTGAACTA-3'

SEQ ID NO : 16 (séquence antisens LHRE_ApoA1_h_7):

5'-GATCTAGTTCAAGGATCAGCTCTGTCCCG-3'

20 **SEQ ID NO : 17** (séquence sens LHRE_ApoA1_h_8):

5'-GATCCAGCTTGCTGTTGCCACTCTATA-3'

SEQ ID NO : 18 (séquence antisens LHRE_ApoA1_h_8):

5'-GATCTATAGAGTGGGCAAACAGCAAGCTG-3'

25

SEQ ID NO : 19 (séquence sens utilisée pour la mutagénèse de ABCmutLuc+):

5'- ggacagagctgattgtgaactcttaagttccacattgcc -3'

SEQ ID NO : 20 (séquence antisens utilisée pour la mutagénèse de ABCmutLuc+):

30 5'- cttaagagttcaacaatcagctctgtccctggggctgg -3'

EXEMPLES

5 **Exemple 1 : Effet de la sur-expression de LRH-1 sur l'activité du promoteur de l'apo AI humaine dans les cellules HepG2.**

L'exemple 1 montre que la sur-expression de hLRH-1 augmente l'activité du fragment -254/+91 (qui comporte les régions A, B et C) du promoteur de l'apo AI, cloné en amont du gène rapporteur luciférase.

Des cellules HepG2 sont co-transfектées par la technique de lipofection (JetPEI selon les indications du fournisseur) avec 100 ng du vecteur pCI-hLRH-1 qui permet la sur-expression de LRH-1 ou du vecteur vide pCI utilisé comme contrôle négatif et 250 ng d'un vecteur rapporteur noté ABCLuc+ qui permet l'expression du gène rapporteur luciférase sous le 10 contrôle du fragment 254/+91 du promoteur de l'apo AI (comprenant les régions A, B, C du promoteur de hApo AI, noté ABCLuc+) ou 250 ng du vecteur rapporteur exempt de promoteur comme contrôle (noté Luc+). Ces constructions sont obtenues par l'échange du 15 gène rapporteur CAT des constructions décrites précédemment [16] avec le gène rapporteur Luciférase extrait du plasmide pGL3 de Promega (Madison, WI, USA) comme décrit 20 précédemment [17]. La quantité totale d'ADN transfecté est établie à 500ng à l'aide du plasmide pBKS+. Après 3 heures de transfection, les cellules sont incubées dans le milieu de culture pendant 36 heures. L'activité Luciférase est ensuite mesurée comme décrit précédemment [17] en présence ou en absence de la protéine LRH-1.

25 La figure 1 montre une augmentation d'un facteur 2 de l'activité Luciférase par la sur-expression de LRH-1 lorsque les cellules HepG2 sont transféctées par la construction ABCLuc+. Cette augmentation n'est pas observée lorsque les cellules sont transféctées avec la construction contrôle Luc+ dépourvue de promoteur.

30 **Exemple 2 : Effet de la sur-expression de LRH-1 sur l'activité du promoteur de l'apo AI humaine dans les cellules RK13**

L'exemple 2 montre que la sur-expression de hLRH-1 augmente l'activité des fragments -254/+91 (qui comporte les régions A,B et C) et -192/+21 (qui comporte les régions B et C) du

promoteur de l'apo AI mais pas des fragments -128/+91 (qui comporte la région C) et -40/+91 (qui ne comporte que le promoteur minimum), clonés en amont du gène rapporteur luciférase.

5 Des cellules RK13 sont co-transfектées par la technique de lipofection (JetPEI selon les indications du fournisseur) avec 100 ng du vecteur pCI-hLRH-1 qui permet la sur-expression de LRH-1 ou du vecteur vide pCI utilisé comme contrôle négatif et 250 ng d'un vecteur rapporteur qui permet l'expression du gène rapporteur luciférase sous le contrôle des fragments -254/+91 (comprenant les régions A, B et C, notées ABCLuc+) , -192/+91
10 (comprenant les régions B et C, notées BCLuc+), -128/+91 (comprenant la région C, notée CLuc+) ou -40/+91 (comprenant le promoteur minimum pmin, noté pmin) du promoteur de l'apo AI ou 250 ng du vecteur rapporteur dépourvu de promoteur comme contrôle (noté Luc+). Ces constructions sont obtenues par l'échange du gène rapporteur CAT des constructions décrites précédemment [16] avec le gène rapporteur Luciférase extrait du
15 plasmide pGL3 de Promega (Madison, WI, USA) comme décrit précédemment [17]. La quantité totale d'ADN transfecté est établie à 500 ng à l'aide du plasmide pBKS+. Après 3 heures de transfection, les cellules sont incubées dans le milieu de culture pendant 36 heures. L'activité Luciférase est ensuite mesurée comme décrit précédemment [17] en présence ou en absence de la protéine LRH-1.

20 La figure 2 montre qu'en présence de LRH-1, l'expression du gène codant pour la luciférase placé sous le contrôle du promoteur de l'Apo AI humain comprenant les régions A, B, C et le promoteur minimum (ABCLuc+ - fragment -254/+91) est augmentée d'un facteur 12 dans les cellules RK13 qui n'expriment pas le récepteur LRH-1 de manière endogène. L'expression de
25 la luciférase contrôlée par une construction comprenant les régions B, C et le promoteur minimum (BCLuc+ -fragment -192/+91) du promoteur de l'Apo AI humain est augmentée d'un facteur 15. L'expression de la luciférase contrôlée par une construction comprenant la région C et le promoteur minimum (CLuc+ - fragment -128/+91) du promoteur de l'Apo AI humain n'est pas affectée. L'expression de la luciférase contrôlée par une construction comprenant seulement le promoteur minimum (pmin - fragment -40/+91) du promoteur de l'Apo AI humain n'est que légèrement stimulée d'un facteur 2.

30 Nous n'observons également pas d'activation de l'expression de la luciférase lorsque les cellules RK13 sont transfectées avec le vecteur rapporteur Luc+ dépourvu de séquence promotrice.

L'expression du gène apoAI est donc bien régulée par la protéine LRH-1. Il existe en cis un site situé au niveau de la région B du promoteur du gène apoAI humain permettant la fixation en trans de la protéine LRH-1.

5 **Exemple 3 : Identification d'un site de fixation de LRH-1 dans le promoteur de l'apo AI humaine**

L'exemple 3 montre que LRH-1 se fixe sur le fragment -144/-122 du promoteur du gène humain de l'apo AI.

10

La protéine hLRH-1 est produite in vitro à l'aide du kit TNT-T7 lysat de réticulocyte de lapin de Promega (ref. L4610) et du vecteur pCI-LRH-1. Des oligonucléotides doubles brins correspondants à l'élément de réponse à LRH-1 présent sur le gène Cyp7a, noté hCyp7a wt, [sens: 5'-GATCTCTAGTTCAAGGCCAGTTAG-3' (SEQ ID NO: 7) et anti-sens: 5'-GATCCTAACTGGCCTTGAACATAAGA-3' (SEQ ID NO: 8)], au même élément de réponse muté, noté hCyp 7 a mut, [sens: 5'-GATCTCTAGTTCAATTCCAGTTAG-3' (SEQ ID NO: 9) et anti-sens: 5'-GATCCTAACTGGAATTGAACATAAGA-3' (SEQ ID NO: 10)], au fragment -191/-171, noté LRHRE_ApoA1_h_5, [sens: 5'-GATCCGCAGCCCCCGCAGCTTGCTGTA-3' (SEQ ID NO: 11) et anti-sens: 5'-GATCTACAGCAAGCTGCAGGGGCTGCG-3' (SEQ ID NO: 12)], au fragment -178/-145, noté LRHRE_ApoA1_h_6, [sens: 5'-GATCCTTGCCCACCTCTATTGCCAGCCCCAA-3' (SEQ ID NO: 13) et anti-sens: 5'-GATCTTGGGGCTGGCAAATAGAGTGGGCAAG-3' (SEQ ID NO: 14)], au fragment -144/-122 sauvage, noté LRHRE_ApoA1_h_7, ou muté, noté LRHRE_ApoA1 mut, [sens: 5'-GATCCGGGACAGAGCTGATCCTTGAACATA-3' (SEQ ID NO: 15) et anti-sens: 5'-GATCTAGTTCAAGGATCAGCTCTGTCCCG-3' (SEQ ID NO: 16)] et au fragment -180/-158, noté LRHRE_ApoA1_h_8, [sens: 5'-GATCCAGCTGCTGTTGCCACCTCTATA-3' (SEQ ID NO: 17) et anti-sens: 5'-GATCTATAGAGTGGGCAAACAGCAAGCTG-3' (SEQ ID NO: 18)] du promoteur du gène humain de l'apo AI (SEQ ID NO: 5) ont été préparés comme décrit précédemment [16], et marqués avec du [γ -³²P]-ATP à l'aide de la polynucléotide kinase.

2 μ l de lysat de réticulocyte de lapin programmés par hLRH-1 sont incubés pendant 15

minutes à température ambiante dans un volume final de 20 μ l de tampon qui contient 10 mM HEPES, 2,5 mM MgCl₂, 10% glycérol, 2,5 mg/ml BSA, 50 mM NaCl et 0,5 mM DTT avec 2,5 μ g de polydI-dC et 1 μ g d'ADN de sperme de hareng en présence des oligonucléotides doubles brins marqués (0,5 ng). Les complexes sont ensuite séparés par électrophorèse sur gel 5 non dénaturant dans du tampon TBE 0,25X.

La figure 3 montre un complexe LRH-1/ADN spécifique lorsque la protéine LRH-1 produite in vitro est incubée en présence d'un oligonucléotide double brin marqué correspondant à l'élément de réponse à LRH-1 présent au niveau du gène Cyp7a (hCyp7a wt). Par contre, 10 aucun complexe n'est détecté en présence de l'oligonucléotide double brin marqué correspondant dont l'élément de réponse est muté (hCyp7a mut).. La figure 3 montre également qu'aucun complexe ADN/LRH-1 n'est détecté avec les oligonucléotides doubles brins correspondant aux fragments -191/-171 (LRHRE_ApoA1_h_5), -178/-145 (LRHRE_ApoA1_h_6), et -180/-158 (LRHRE_ApoA1_h_8), du promoteur du gène humain 15 de l'apo AI. Par contre, la figure 3 montre la présence d'un complexe ADN/LRH-1 spécifique lorsque l'oligonucléotide double brin marqué correspond au fragment -144/-122 (LRHRE_ApoA1_h_7) du promoteur du gène humain de l'apo AI. Ce fragment est situé à cheval sur les régions B et C du promoteur du gène humain de l'apo AI et comporte, sur le 20 brin antisens, la séquence TCAAGGATC proche de la séquence consensus TCAAGGTCA d'un élément de réponse à LRH-1. Cet élément est fonctionnel du fait que la figure 3 montre que l'oligonucléotide double brin correspondant dont la séquence TCAAGGATC est mutée (TCAACAATC) est incapable de former un complexe avec LRH-1(LRHRE_ApoA1 mut).

Exemple 4 : Le fragment -144/-122 du promoteur du gène humain de l'apo AI est un 25 élément de réponse de faible affinité à LRH-1

L'exemple 4 montre que le fragment -144/-122 du promoteur du gène humain de l'apo AI est un site à faible affinité pour LRH-1.

30 La protéine hLRH-1 est produite in vitro à l'aide du kit TNT-T7 lysat de réticulocyte de lapin de Promega (ref. L4610) et du vecteur pCI-LRH-1. Des oligonucléotides doubles brins correspondants à l'élément de réponse à LRH-1 présent sur le gène Cyp7a (noté LRH-1-SondeCyp7a) ou au fragment sauvage -144/-122 (ApoA1_h_7) du promoteur du gène humain de l'apo AI (SEQ ID NO : 4) ont été préparés comme décrit précédemment [16], et marqués

avec du [γ -³²P]-ATP à l'aide de la polynucléotide kinase. 2 μ l de lysat de réticulocyte programmés par hLRH-1 sont incubés pendant 15 minutes à 4°C dans un volume final de 20 μ l de tampon qui contient 10 mM HEPES, 2,5 mM MgCl₂, 10% glycérol, 2,5 mg/ml BSA, 50 mM NaCl et 0,5 mM DTT avec 2,5 μ g de polydI-dC et 1 μ g d'ADN de sperme de hareng 5 en présence des oligonucléotides doubles brins non marqués en excès (10X, 50 X et 100X) par rapport à la sonde marquée utilisée (0,5 ng). Les oligonucléotides doubles brins marqués (0,5ng) sont ensuite ajoutés au mélange et incubés à température ambiante pendant 15 minutes avant que les complexes soient ensuite séparés par électrophorèse sur gel non dénaturant dans du tampon TBE 0,25X.

10

La figure 4A montre qu'un oligonucléotide double brin non radioactif correspondant au fragment -144/-122 du promoteur du gène humain de l'apo AI déplace partiellement le complexe formé entre LRH-1 et un oligonucléotide double brin marqué correspondant à l'élément de réponse à LRH-1 présent au niveau du gène Cyp7a. Par contre, la figure 4A ne 15 montre aucun déplacement du complexe formé entre LRH-1 et un oligonucléotide double brin marqué correspondant à l'élément de réponse à LRH-1 présent au niveau du gène Cyp7a par un oligonucléotide double brin non radioactif correspondant au fragment -144/-122 muté du promoteur du gène humain de l'apo AI.

La figure 4B montre qu'un oligonucléotide double brin non radioactif correspondant à 20 l'élément de réponse à LRH-1 présent au niveau du gène Cyp7a déplace totalement le complexe formé entre LRH-1 et un oligonucléotide double brin marqué correspondant au fragment -144/-122 du promoteur du gène humain de l'apo AI. Par contre, la figure 4B ne montre aucun déplacement du complexe formé entre LRH-1 et un oligonucléotide double brin marqué correspondant au fragment -144/-122 du promoteur du gène humain de l'apo AI par 25 un oligonucléotide double brin non radioactif correspondant à l'élément de réponse muté à LRH-1 présent au niveau du gène Cyp7a. La comparaison des résultats présentés dans les figures 4A et B indique que l'affinité pour LRH-1 du fragment -144/-122 du promoteur du gène humain de l'apo AI est inférieure à celle de l'élément de réponse à LRH-1 présent au niveau du gène Cyp7a.

30

Exemple 5: Effet de la surexpression de LRH-1 sur l'activité du promoteur de l'apo AI humaine muté ou non dans les cellules HuH7.

5 L'exemple 5 montre que la mutation du site TCAAGGATC présent dans le fragment -144/-122 du promoteur du gène humain de l'apo AI réduit la sensibilité à LRH-1 d'une construction qui comporte le fragment -254/+91 du promoteur du gène humain de l'apo AI.

10 Des cellules HuH7 sont co-transfектées par la technique de lipofection (JetPEI selon les indications du fournisseur) avec 100 ng du vecteur pCI-hLRH-1 qui permet la sur-expression de LRH-1 ou du vecteur vide pCI utilisé comme contrôle négatif et 50 ng d'un vecteur rapporteur qui permet l'expression du gène rapporteur luciférase sous le contrôle du fragment -254/+91 comprenant les régions A, B et C sauvage du promoteur de l'apo AI (notées ABC Luc+), sous le contrôle du fragment -254/+91 comprenant les sites A, B et C du promoteur de l'apo AI dont le site TCAAGGATC est muté (notés ABCmutLuc+), sous le contrôle du fragment -192/+91 comprenant les régions B et C du promoteur de hApo AI (noté BCLuc+), sous le contrôle du fragment -128/+91 comprenant la région C du promoteur de l'apo AI (noté Cluc+), sous le contrôle du fragment -40/+91 comprenant le promoteur minimum de l'apo AI (noté pmin) ou 50 ng du vecteur rapporteur dépourvu de promoteur comme contrôle (noté Luc+).

15 20 La construction ABCmutLuc+ est obtenue par mutagenèse dirigée de la construction ABCLuc+ sauvage, à l'aide du kit Quick Change Site directed mutagenesis (Stratagene) correspondant aux séquences sens SEQ ID NO 19 et antisens SEQ ID NO 20.

25 La figure 5 montre une augmentation d'un facteur 5,8 de l'activité Luciférase par la sur-expression de LRH-1 lorsque les cellules HuH7 sont transfectées par la construction ABCLuc+ et de 2,6 lorsque les cellules HuH7 sont transfectées par la construction BCLuc+. Cette augmentation n'est pas ou peu observée lorsque les cellules sont transfectées avec les constructions comprenant les sites A, B et C du promoteur de l'apo AI dont le site TCAAGGATC est muté (ABCmutLuc+), la région C du promoteur de l'apo AI (Cluc+), le 30 promoteur minimum de l'apo AI (pmin) ou la construction dépourvue de promoteur (Luc+).

L'exemple 5 montre que le site TCAAGGATC présent dans le fragment -144/-122 du promoteur du gène humain de l'apo AI sensibilise celui-ci à LRH-1.

Exemple 6: Effet de la surexpression de LRH-1 sur l'activité de différents mutants du promoteur de l'apo AI humaine dans les cellules HuH7.

5 L'exemple 6 montre que la mutation du site TCAAGGATC présent dans le fragment -144/-122 réduit la sensibilité à LRH-1 d'une construction qui comporte le fragment -254/+91 du promoteur du gène humain de l'apo AI cloné en amont du gène rapporteur luciférase contrairement à la mutation de l'élément de réponse à FXR du promoteur du gène humain de l'apo AI adjacent.

10 10 Des cellules HuH7 sont co-transfектées par la technique de lipofection (JétPEI selon les indications du fournisseur) avec 100ng du vecteur pCI-hLRH-1 qui permet la sur-expression de LRH-1 ou du vecteur vide pCI utilisé comme contrôle négatif et 50 ng d'un vecteur rapporteur qui permet l'expression du gène rapporteur luciférase sous le contrôle du fragment -254/+91 comprenant les régions A, B et C sauvage du promoteur de l'apo AI (notées ABC 15 Luc+ et ABCpGL3), sous le contrôle du fragment -254/+91 comprenant les sites A, B et C du promoteur de l'apo AI dont le site TCAAGGATC est muté (notés ABCmutLuc+ - cf.exemple 5), sous le contrôle du fragment -254/+91 comprenant les sites A, B et C du promoteur de l'apo AI dont l'élément de réponse à FXR est muté (notés ABCpGL3FXREKO), sous le contrôle du fragment -192/+91 comprenant les régions B et C 20 du promoteur de hApo AI (notées BCLuc+ et BCpGL3), sous le contrôle du fragment -192/+91 dont l'élément de réponse à FXR est muté (noté BCpGL3FXREKO), sous le contrôle du fragment -128/+91 comprenant la région C du promoteur de l'apo AI (noté Cluc+), sous le contrôle du fragment -40/+91 comprenant le promoteur minimum de l'apo AI 25 (noté pmin) ou 50 ng des vecteur rapporteurs dépourvus de promoteur comme contrôle (notés Luc+ et pGL3).

La construction ABCpGL3 a été obtenue par sous-clonage du fragment -254/+91 du promoteur du gène de l'apoAI du vecteur ABCLuc+ (digestion par SalI/SphI) dans le vecteur pGL3 de Promega (digéré par XhoI/SphI). La construction ABCpGL3FXREKO a été 30 obtenue par sous-clonage du fragment muté -254/+91 du promoteur du gène de l'apoAI du vecteur ABCLuc+FXREKO décrit précédemment [18] (digestion par SalI/SphI) dans le vecteur pGL3 (digéré par XhoI/SphI). Les constructions BCpGL3 et BCpGL3FXREKO ont été obtenues par digestion partielle et re-ligation des constructions ABCpGL3 et ABCpGL3FXREKO, respectivement.

La figure 6 montre une augmentation d'un facteur 4,8 de l'activité Luciférase par la sur-expression de LRH-1 lorsque les cellules HuH7 sont transfectées par la construction ABCLuc+, de 2.1 lorsque les cellules HuH7 sont transfectées par la construction BCLuc+, de 8.7 lorsque les cellules HuH7 sont transfectées par la construction ABCpGL3, de 11.5 lorsque les cellules HuH7 sont transfectées par la construction ABCpGL3FXREKO, de 1,9 lorsque les cellules HuH7 sont transfectées par la construction BCpGL3 et de 2.4 lorsque les cellules HuH7 sont transfectées par la construction BCpGL3FXREKO. Cette augmentation n'est pas ou peu observée lorsque les cellules sont transfectées avec les constructions comprenant les sites A, B et C du promoteur de l'apo AI dont le site TCAAGGATC est muté (ABCmutLuc+), la région C du promoteur de l'apo AI (Cluc+), le promoteur minimum de l'apo AI (pmin) ou les constructions dépourvues de promoteur (Luc+ et pGL3).

L'exemple 6 montre que le site TCAAGGATC présent dans le fragment -144/-122 du promoteur du gène humain de l'apo AI sensibilise celui-ci à LRH-1. La présence de l'élément de réponse à FXR adjacent à l'élément de réponse à LRH ne semble pas nécessaire à la réponse à LRH.

Bien que physiquement proches, ces éléments de réponse sont donc fonctionnellement distincts.

REFERENCES

1. Francis, G.A., et al., *Nuclear receptors and the control of metabolism*. Annu Rev Physiol, 2003. 65: p. 261-311.
- 5 2. Zhang, C.K., et al., *Characterization of the genomic structure and tissue-specific promoter of the human nuclear receptor NR5A2 (hB1F) gene*. Gene, 2001. 273(2): p. 239-49.
- 10 3. Sirianni, R., et al., *Liver receptor homologue-1 is expressed in human steroidogenic tissues and activates transcription of genes encoding steroidogenic enzymes*. J Endocrinol, 2002. 174(3): p. R13-7.
4. Ellinger-Ziegelbauer, H., et al., *FTZ-F1-related orphan receptors in Xenopus laevis: transcriptional regulators differentially expressed during early embryogenesis*. Mol Cell Biol, 1994. 14(4): p. 2786-97.
- 15 5. Lin, W., et al., *Zebrafish ftz-f1 gene has two promoters, is alternatively spliced, and is expressed in digestive organs*. Biochem J, 2000. 348 Pt 2: p. 439-46.
6. Chen, F., et al., *Liver Receptor Homologue-1 Mediates Species- and Cell Line-specific Bile Acid-dependent Negative Feedback Regulation of the Apical Sodium- dependent Bile Acid Transporter*. J Biol Chem, 2003. 278(22): p. 19909-16.
- 20 7. Schoonjans, K., et al., *Liver receptor homolog 1 controls the expression of the scavenger receptor class B type I*. EMBO Rep, 2002. 3(12): p. 1181-7.
8. Le Goff, W., et al., *A CYP7A promoter binding factor site and Alu repeat in the distal promoter region are implicated in regulation of human CETP gene expression*. J Lipid Res, 2003. 44(5): p. 902-10.
- 25 9. Segrest, J., et al., *Structure and function of apolipoprotein A-I and high-density lipoprotein*. Curr Opin Lipidol, 2000. 11(2): p. 105-15.
10. Fruchart, J. and P. Duriez, *High density lipoproteins and coronary heart disease. Future prospects in gene therapy*. Biochimie, 1998. 80(2): p. 167-72.
11. Leroy, A., J. Dallongeville, and J. Fruchart, *Apolipoprotein A-I-containing lipoproteins and atherosclerosis*. Curr Opin Lipidol, 1995. 6(5): p. 281-5.
- 30 12. Breslow, J., et al., *Isolation and characterization of cDNA clones for human apolipoprotein A-I*. PNAS, 1982. 79(22): p. 6861-6865.

13. Shoulders, C. and F. Baralle, *Isolation of the human HDL apolipoprotein AI gene*. Nucleic Acids Res., 1982. **10**(16): p. 4873-4882.
14. Karathanasis, S., et al., *Linkage of human apolipoproteins A-I and C-III genes*. Nature, 1983. **304**(5924): p. 371-3.
- 5 15. Widom, R., et al., *Synergistic interactions between transcription factors control expression of the apolipoprotein AI gene in liver cells*. Mol. Cell. Biol., 1991. **11**(2): p. 677-687.
- 10 16. Vu-Dac, N., et al., *Negative regulation of the human apolipoprotein A-I promoter by fibrates can be attenuated by the interaction of the peroxisome proliferator-activated receptor with its response element*. J. Biol. Chem., 1994. **269**(49): p. 31012-31018.
17. Raspe, E., et al., *Modulation of rat liver apolipoprotein gene expression and serum lipid levels by tetradecylthioacetic acid (TTA) via PPAR{alpha} activation*. J. Lipid Res., 1999. **40**(11): p. 2099-2110.
- 15 18. Claudel, T., et al., *Bile acid-activated nuclear receptor FXR suppresses apolipoprotein A-I transcription via a negative FXR response element*. J Clin Invest., 2002. **109**(7) : p.961-971

REVENDICATIONS

1. Méthode pour la sélection, l'identification ou la caractérisation de composés capables de moduler le transport inverse du cholestérol, qui comprend :
 - la mise en contact d'un composé test avec une construction d'acide nucléique comprenant au moins une copie d'un élément de réponse à LRH-1 du promoteur du gène humain de l'apolipoprotéine AI ou d'un variant fonctionnel de celui-ci, et
 - la détermination de la liaison éventuelle dudit composé test sur l'élément de réponse.
2. Méthode selon la revendication 1, caractérisée en ce que la mise en contact est effectuée en présence du récepteur LRH-1 exogène ou d'un équivalent fonctionnel de ce dernier, et en ce que l'on détermine la liaison éventuelle dudit composé test sur l'élément de réponse à LRH-1 et/ou sur le complexe formé par la liaison de LRH-1 à son élément de réponse.
3. Méthode pour la sélection, l'identification ou la caractérisation de composés capables de moduler le transport inverse du cholestérol, qui comprend :
 - (i) la mise en contact d'un composé test avec une cellule hôte comprenant une cassette d'expression d'un gène rapporteur, ladite cassette comprenant un gène rapporteur placé sous le contrôle d'un promoteur contenant au moins une copie d'un élément de réponse à LRH-1 du promoteur du gène humain de l'apo AI ou d'un variant fonctionnel de celui-ci, et
 - (ii) la détermination de l'effet de la présence du composé test sur la liaison de LRH-1 à l'élément de réponse ou sur l'expression du gène rapporteur.
4. Méthode selon la revendication 3, caractérisée en ce que la cellule hôte comprend un récepteur LRH-1 exogène ou un équivalent fonctionnel de ce dernier.
5. Méthode selon l'une des revendications 3 ou 4, caractérisée en ce que la cellule hôte comprend un ligand de LRH-1.

6. Méthode selon l'une des revendications 3 à 5 comprenant la détermination du niveau d'expression du gène rapporteur en présence du composé test et en l'absence dudit composé, une augmentation ou une diminution du niveau d'expression du gène rapporteur signalant l'aptitude du composé test à moduler le transport inverse du cholestérol.
7. Méthode selon l'une des revendications 3 à 6, caractérisée en ce que la cellule hôte est une cellule de mammifère.
8. Méthode selon la revendication 7, caractérisée en ce que la cellule de mammifère est une cellule humaine.
9. Méthode selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisée en ce que l'élément de réponse à LRH-1 comprend la séquence (SEQ ID NO : 1) suivante : 5'-CTGATCCTTGAAC-3' ou un variant fonctionnel de celle-ci capable de lier le récepteur LRH-1.
10. Méthode selon l'une des revendications 3 à 9, caractérisée en ce que le gène rapporteur est un gène codant un produit dont l'activité ou la présence dans des extraits biologiques peut être mesurée, notamment l'un des gènes codant pour la luciférase, la phosphatase alcaline sécrétée, la galactosidase ou la lactamase.
11. Méthode selon l'une des revendications 3 à 10, caractérisée en ce que le promoteur est choisi parmi le promoteur HSV-TK, le promoteur immédiat du CMV, le promoteur PGK et le promoteur du gène codant pour l'apolipoprotéine AI humaine, le promoteur SV40.
12. Méthode selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisée en ce qu'un ou plusieurs composés sont testés, en mélange ou de manière séparée.
13. Méthode selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisée en ce que le composé test est une banque combinatoire.
14. Méthode selon la revendication 13 caractérisée en ce que le composé test est un clone

ou une banque de clones d'acides nucléiques exprimant un ou plusieurs polypeptide(s) liant l'ADN.

15. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que la mise en contact est réalisée dans une plaque multipuits.

16. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes comprenant, en outre, la comparaison des effets éventuels déterminés grâce à ladite méthode avec ceux, éventuels, déterminés grâce à une méthode réalisée dans les mêmes conditions mais avec une construction d'acide nucléique comprenant au moins une copie mutée d'un élément de réponse à LRH-1 du promoteur du gène codant pour l'apolipoprotéine AI humaine, ladite copie mutée étant essentiellement incapable de lier le récepteur LRH-1.

17. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, pour la sélection, l'identification ou la caractérisation de composés capables d'augmenter le transport inverse du cholestérol.

18. Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 16, pour la sélection, l'identification ou la caractérisation de composés capables de moduler l'activité des HDL.

19. Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 16, pour la sélection, l'identification ou la caractérisation de composés capables de moduler l'expression de l'apolipoprotéine AI.

20. Utilisation d'un composé capable de moduler la liaison de LRH-1 et/ou de ses cofacteurs à l'élément de réponse du promoteur du gène codant pour l'apolipoprotéine AI humaine ou d'un variant fonctionnel de celui-ci, pour la préparation d'une composition destinée à moduler le transport inverse du cholestérol.

21. Utilisation d'un composé augmentant la liaison de LRH-1 et/ou de ses cofacteurs à la séquence SEQ ID NO : 1 ou un variant fonctionnel de celle-ci, pour la préparation d'une composition destinée à augmenter le transport inverse du cholestérol.

ou une banque de clones d'acides nucléiques exprimant un ou plusieurs polypeptide(s) liant l'ADN.

15. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que la mise en contact est réalisée dans une plaque multipuits.

16. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes comprenant, en outre, la comparaison des effets éventuels déterminés grâce à ladite méthode avec ceux, éventuels, déterminés grâce à une méthode réalisée dans les mêmes conditions mais avec une construction d'acide nucléique comprenant au moins une copie mutée d'un élément de réponse à LRH-1 du promoteur du gène codant pour l'apolipoprotéine AI humaine, ladite copie mutée étant essentiellement incapable de lier le récepteur LRH-1.

17. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, pour la sélection, l'identification ou la caractérisation de composés capables d'augmenter le transport inverse du cholestérol.

18. Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 16, pour la sélection, l'identification ou la caractérisation de composés capables de moduler l'activité des HDL.

19. Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 16, pour la sélection, l'identification ou la caractérisation de composés capables de moduler l'expression de l'apolipoprotéine AI.

20. Fragment d'acide nucléique caractérisé par la séquence (SEQ ID NO : 1) suivante :

5'-CTGATCCTTGAAC-3'

ou un variant de celle-ci capable de lier le récepteur LRH-1.

21. Construction d'acide nucléique comprenant au moins une copie du fragment d'acide nucléique selon la revendication 20 .

22. Construction d'acide nucléique comprenant au moins une copie mutée du fragment

22. Utilisation d'un composé modulant la liaison de LRH-1 et/ou de ses cofacteurs à la séquence SEQ ID NO : 1 ou un variant fonctionnel de celle-ci, pour la préparation d'une composition destinée à moduler l'activité des HDL.
23. Utilisation d'un composé augmentant la liaison de LRH-1 et/ou de ses cofacteurs à la séquence SEQ ID NO : 1 ou un variant fonctionnel de celle-ci, pour la préparation d'une composition destinée à augmenter l'activité des HDL.
24. Utilisation d'un composé modulant la liaison de LRH-1 et/ou de ses cofacteurs à la séquence SEQ ID NO : 1 ou un variant fonctionnel de celle-ci, pour la préparation d'une composition destinée à moduler l'expression de l'ApoAI.
25. Utilisation d'un composé augmentant l'effet de LRH-1 et/ou de ses cofacteurs sur la transcription du gène humain de l'apolipoprotéine AI pour la préparation d'une composition destinée à moduler le transport inverse du cholestérol.
26. Utilisation selon l'une des revendications 20 à 25 dans laquelle ledit composé est un composé biologique ou un composé chimique.
27. Utilisation selon l'une des revendications 20 à 25, caractérisée en ce que le composé est un facteur nucléaire ou un cofacteur.
28. Utilisation selon l'une des revendications 20 à 25, caractérisée en ce que le composé est un clone exprimant un ou plusieurs polypeptide(s) liant l'ADN.
29. Utilisation selon l'une des revendications 20 à 25, caractérisée en ce que le composé est un composé sélectionné, identifié ou caractérisé selon l'une des revendications 1 à 19.
30. Fragment d'acide nucléique caractérisé par la séquence (SEQ ID NO : 1) suivante :
5'-CTGATCCTGAAAC-3'
ou un variant de celle-ci capable de lier le récepteur LRH-1.

d'acide nucléique selon la revendication 20, ladite copie mutée étant essentiellement incapable de lier le récepteur LRH-1.

23. Cassette d'expression comprenant au moins une copie du fragment d'acide nucléique selon la revendication 20, et un promoteur associé à un gène rapporteur placé sous le contrôle dudit promoteur.

24. Cassette d'expression comprenant au moins une copie mutée du fragment d'acide nucléique selon la revendication 20, et un promoteur associé à un gène rapporteur placé sous le contrôle dudit promoteur.

25. Cassette selon l'une des revendications 23 ou 24, caractérisée en ce que ledit promoteur est choisi parmi le promoteur HSV-TK, le promoteur immédiat du CMV, le promoteur PGK, le promoteur SV-40 et le promoteur du gène codant pour l'apolipoprotéine AI humaine.

26. Cassette selon l'une des revendications 23 à 25, caractérisée en ce que le gène rapporteur est le gène codant pour la luciférase, la phosphatase alcaline sécrétée, la galactosidase ou la lactamase.

27. Cellule hôte contenant une construction ou une cassette selon l'une des revendications 21 à 26.

28. Utilisation d'une construction ou cassette selon l'une des revendications 21 à 26 ou d'une cellule selon la revendication 27, pour le criblage in vitro de composés capables de moduler l'activité des HDL.

31. Construction d'acide nucléique comprenant au moins une copie du fragment d'acide nucléique selon la revendication 30 .
32. Construction d'acide nucléique comprenant au moins une copie mutée du fragment d'acide nucléique selon la revendication 30, ladite copie mutée étant essentiellement incapable de lier le récepteur LRH-1.
33. Cassette d'expression comprenant au moins une copie du fragment d'acide nucléique selon la revendication 30, et un promoteur associé à un gène rapporteur placé sous le contrôle dudit promoteur.
34. Cassette d'expression comprenant au moins une copie mutée du fragment d'acide nucléique selon la revendication 30, et un promoteur associé à un gène rapporteur placé sous le contrôle dudit promoteur.
35. Cassette selon l'une des revendications 33 ou 34, caractérisée en ce que ledit promoteur est choisi parmi le promoteur HSV-TK, le promoteur immédiat du CMV, le promoteur PGK, le promoteur SV-40 et le promoteur du gène codant pour l'apolipoprotéine AI humaine.
36. Cassette selon l'une des revendications 33 à 35, caractérisée en ce que le gène rapporteur est un gène dont l'activité ou la présence dans des extraits biologiques peut être mesurée.
37. Cassette selon la revendication 36, caractérisée en ce que le gène rapporteur est le gène codant pour la luciférase, la phosphatase alcaline sécrétée, la galactosidase ou la lactamase.
38. Cellule hôte contenant une construction ou une cassette selon l'une des revendications 31 à 37.
39. Utilisation d'une construction ou cassette selon l'une des revendications 31 à 37 ou d'une cellule selon la revendication 38, pour le criblage in vitro de composés capables de moduler l'activité des HDL.

40. Composition pharmaceutique comprenant un composé sélectionné, identifié ou caractérisé selon l'une des méthodes revendiquées dans les revendications 1 à 19.

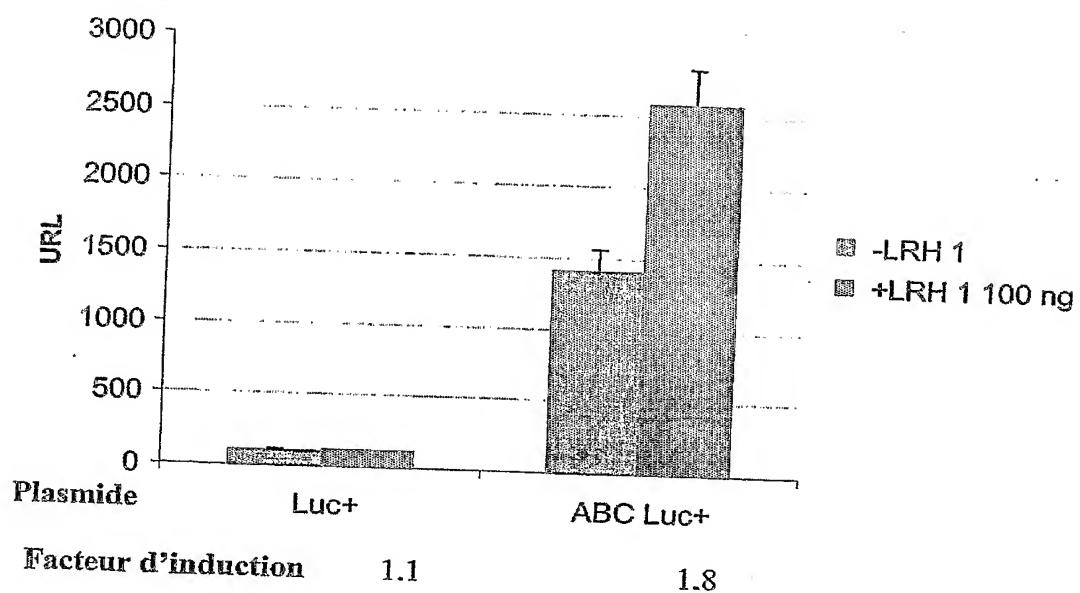


Figure 1

2/7

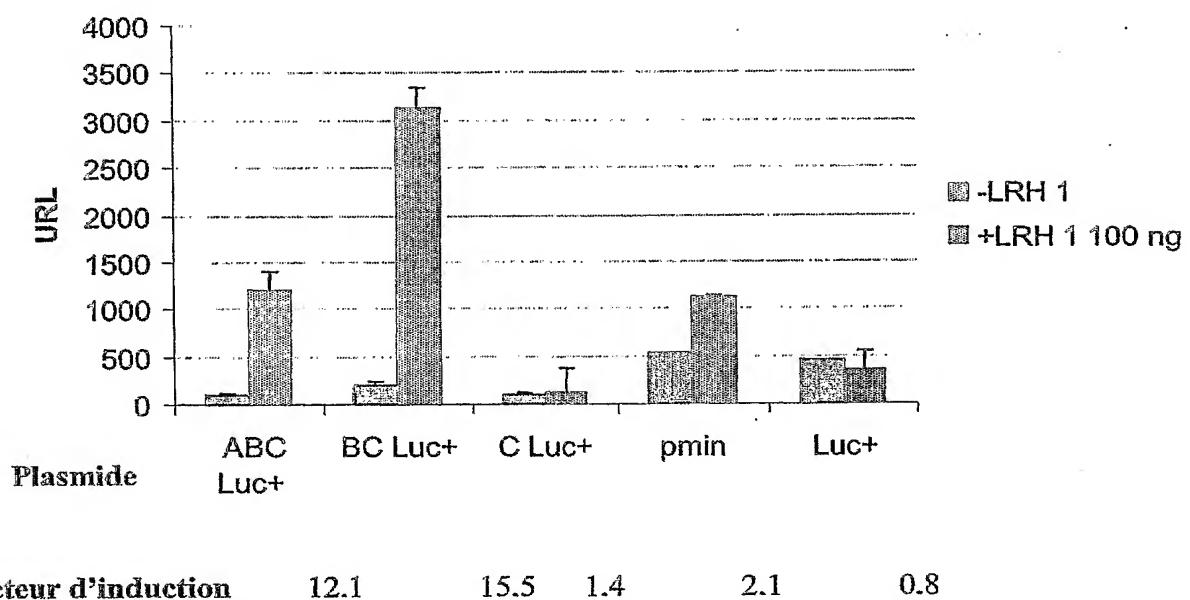


Figure 2

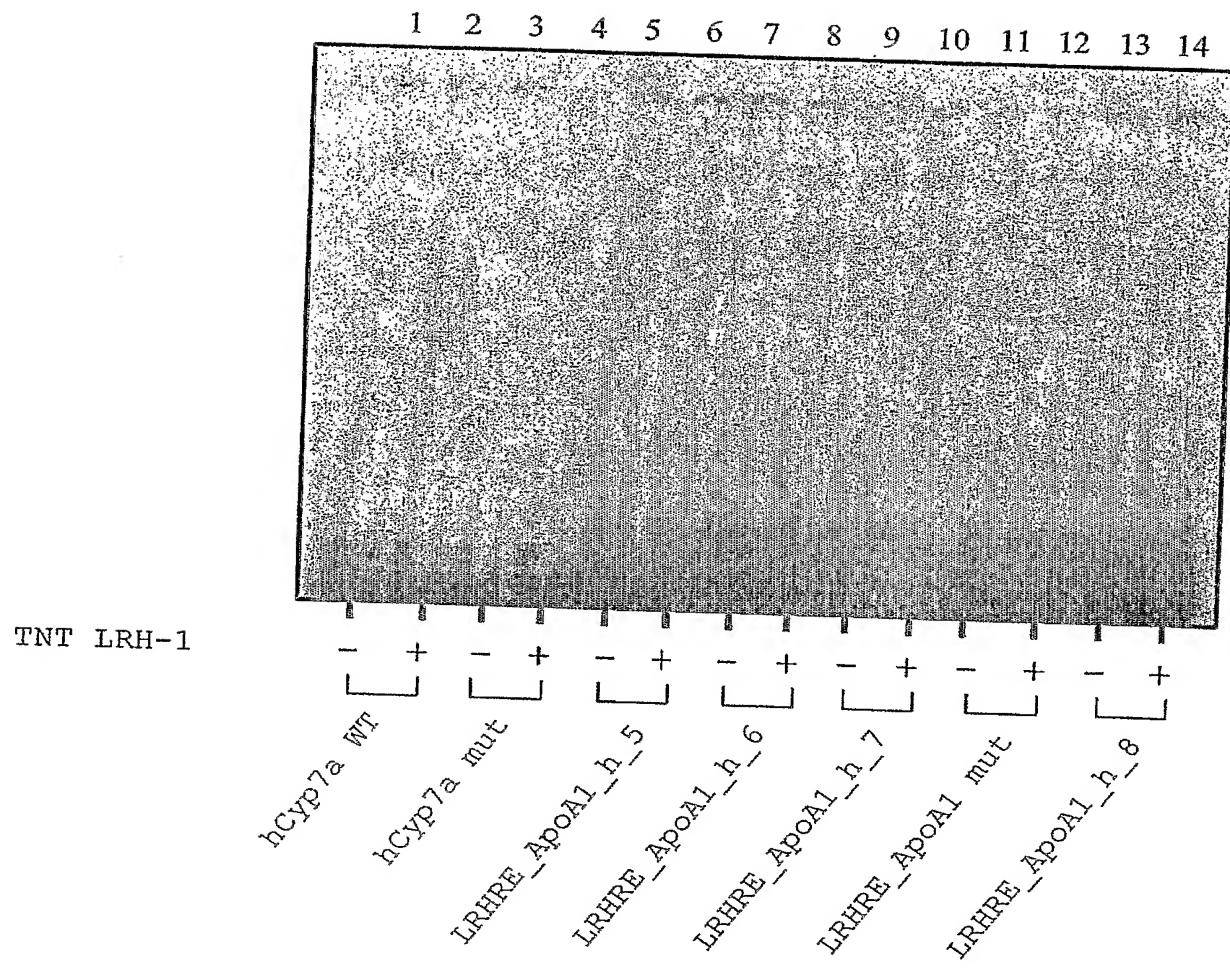


Figure 3

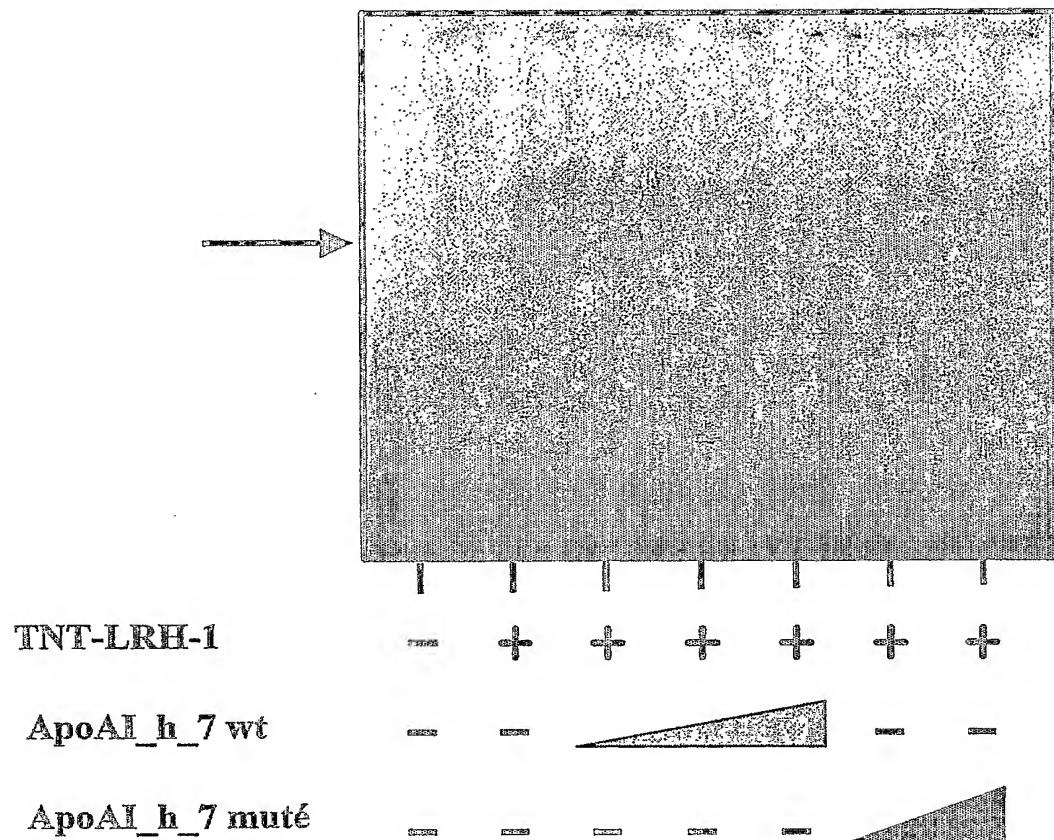


Figure 4A

5/7

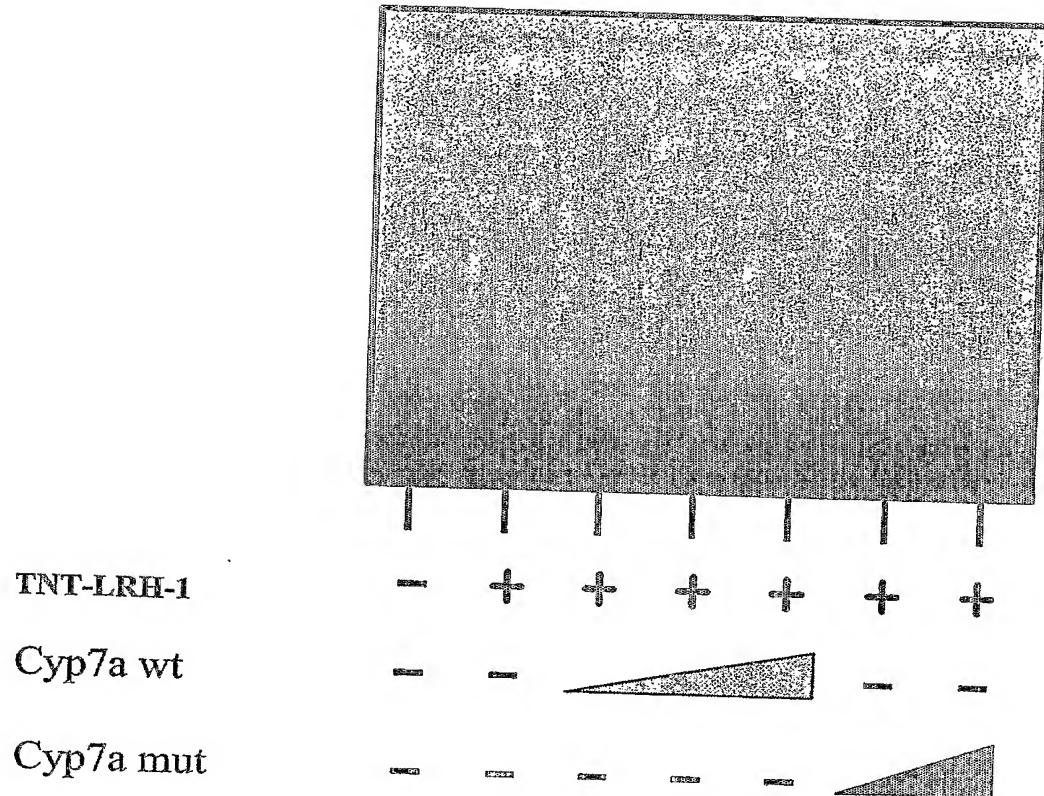


Figure 4B

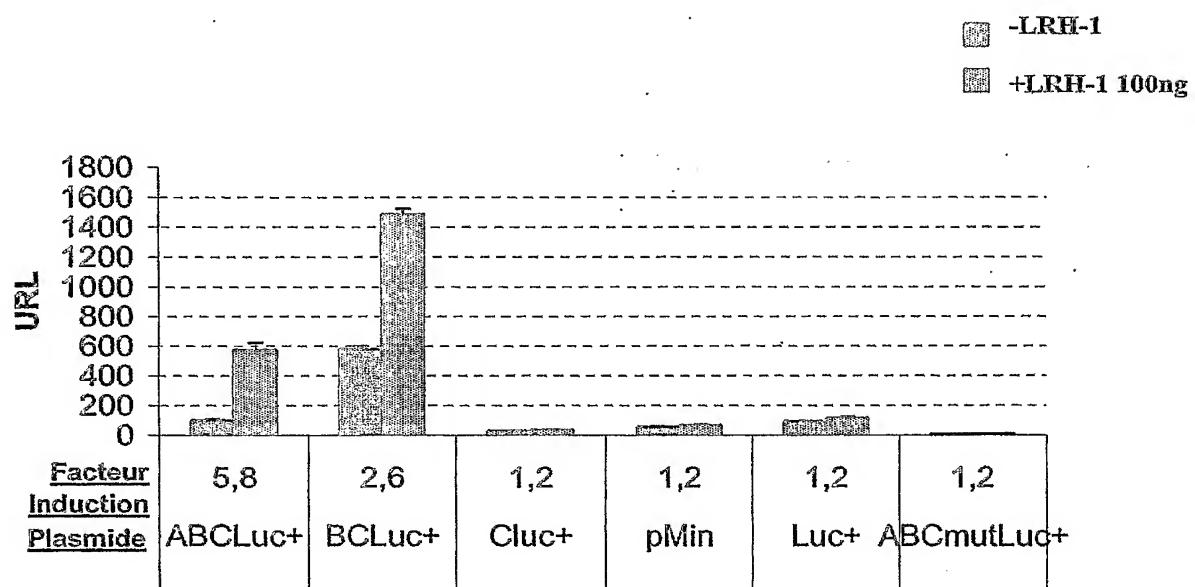


Figure 5

7/7

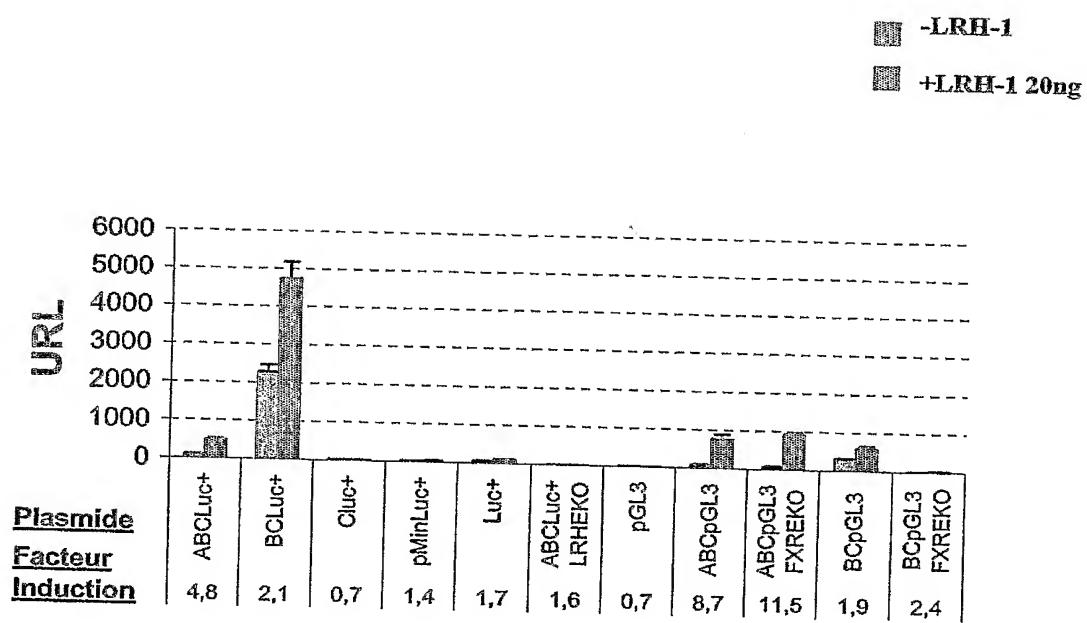


Figure 6

LISTE DE SEQUENCES

<110> GENFIT SA

<120> Procédé pour identifier des composés modulant le transport inverse du cholestérol.

<130> B0219FR

<140>

<141>

<160> 20

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 13

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: Elément de réponse à LRH-1 du promoteur du gène de l'Apo AI humaine.

<400> 1

ctgatcccttg aac

13

<210> 2

<211> 13

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: Elément de réponse à LRH-1 muté du gène de l'Apo AI muté.

<400> 2

ctgatttttg aac

13

<210> 3

<211> 65

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: Région B
du promoteur du gène de l'Apo AI humaine.

<400> 3

gcagccccccg cagcttgctg tttgccact ctatttgccc agccccaggg acagagctga 60
tcctt 65

<210> 4

<211> 87

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: Région C
du promoteur du gène de l'Apo AI humaine.

<400> 4

gaactcttaa gttccacatt gccaggacca gtgagcagca acagggccgg ggctgggctt 60
atcagcctcc cagcccagac cctggct 87

<210> 5

<211> 349

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: Promoteur
de l'Apo AI - j04066 (gène Apo AI) 1819-2167.

<400> 5

gggagacctg caaggctgca gcactccct cccgccccca ctgaaccctt gacccctgcc 60
ctgcagcccc cgcaagctgc tggggccca ctctatttgc ccagccccag ggacagagct 120
gatccttggaa ctcttaagtt ccacattgcc aggaccagtg agcagcaaca gggccggggc 180
tggggcttatac agcctcccag cccagaccct ggctgcagac ataaataggc cctgcaagag 240
ctggctgctt agagactgctc agaaggaggt gcgtcctgct gcctgccccg gtcactctgg 300
ctccccagct caaggttgc aggttgcaggc agggccggcc tctgggtac 349

<210> 6

<211> 166

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: Promoteur

TK - M80483 (pBLCAT5) 38-204; J02224 (Herpes simplex) 302-462.

<400> 6

tgcccccggcc agcgtttgt cattggcgaa ttcaacacg cagatgcagt cggggcggcg 60
cggtccaggt ccacttcgca tattaagggtg acgcgtgtgg cctcaacac cgagcgaccc 120
tgcagcgacc cgcttaacag cgtcaacacg tgccgcagat cacgag 166

<210> 7

<211> 25

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: Séquence sens de hCyp7a wt.

<400> 7

gatctcttag ttcaaggcca gttag

25

<210> 8

<211> 25

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: Séquence antisens de hCyp7a wt.

<400> 8

gatcctaact ggcccttgaac taaga

25

<210> 9

<211> 25

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: Séquence sens hCyp 7 a mut.

<400> 9

gatctcttag ttcaattcca gttag

25

<210> 10
<211> 25
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: Séquence
antisens hCyp 7a mut.

<400> 10
gatccttaact ggaattgaac taaga

25

<210> 11
<211> 27
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: Séquence
sens LHRE_ApoAI_h_5.

<400> 11
gatccgcagc ccccgccagct tgctgta

27

<210> 12
<211> 27
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: Séquence
antisens LHRE_ApoAI_h_5.

<400> 12
gatctacagc aagctgcggg ggctgcg

27

<210> 13
<211> 32
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: Séquence
sens LHRE_ApoAI_h_6.

<400> 13
gatccttgcc cactctatTTT gcccagcccc aa 32

<210> 14
<211> 32
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: Séquence antisens LHRE_ApoAI_h_6.

<400> 14
gatcttgggg ctgggcaaAT agagtgggca ag 32

<210> 15
<211> 29
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: Séquence sens LHRE_ApoAI_h_7.

<400> 15
gatccgggac agagctgatc cttgaacta 29

<210> 16
<211> 29
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: Séquence antisens LHRE_ApoAI_h_7.

<400> 16
gatcttagttc aaggatcagc tctgtcccg 29

<210> 17
<211> 29
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: Séquence sens LHRE_ApoAI_h_8.

<400> 17

gatccagctt gctgttgcc cactctata

29

<210> 18

<211> 29

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: Séquence antisens LHRE_ApoAI_h_8.

<400> 18

gatctataga gtgggcaaac agcaagctg

29

<210> 19

<211> 40

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: Séquence sens utilisée pour la mutagénèse de ABCmutLuc+.

<400> 19

ggacagagct gattgttgaa ctcttaagtt ccacattgcc

40

<210> 20

<211> 38

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: Séquence antisens utilisée pour la mutagénèse de ABCmutLuc+.

<400> 20

cttaagagtt caacaatcag ctctgtccct ggggctgg

38



DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11235*02

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1.../1..

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

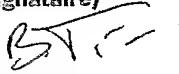
DB 113 W /260899

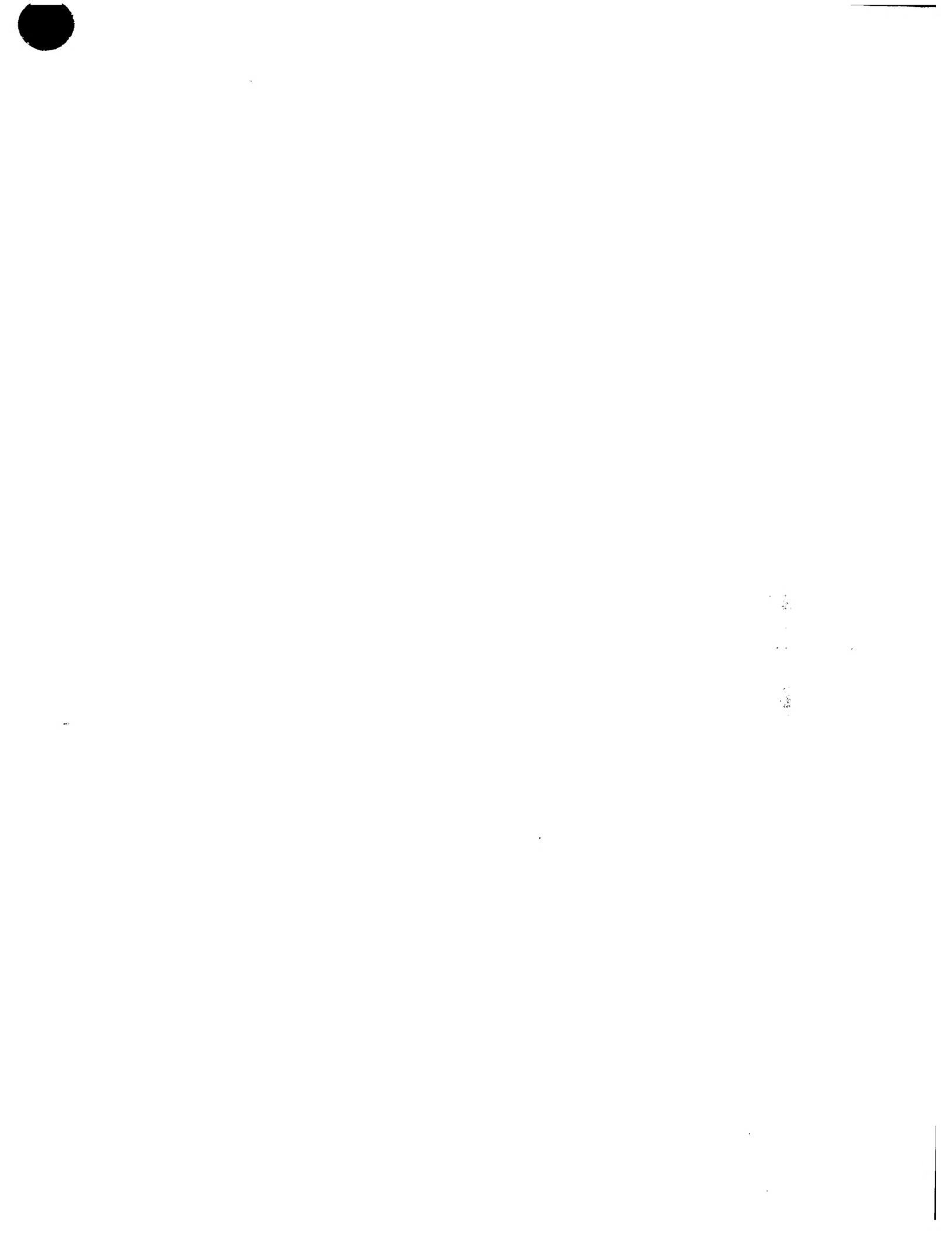
Vos références pour ce dossier (facultatif)	B0219FR
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL	0315973
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) Procédé pour identifier des composés modulant le transport inverse du cholestérol	

LE(S) DEMANDEUR(S) :

GENFIT

DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).

Nom	STAELS		
Prénoms	Bart		
Adresse	Rue	22, rue de la Houille	
	Code postal et ville	7850	PETIT ENGHEN (Belgique)
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) le 23 décembre 2003  TEZIER HERMAN Béatrice n° 00-10000			





PCT/FR2004/003373

